



La mégaline/lrp2 exprimée dans le neuroépithélium antérieur est critique pour la croissance oculaire

Antoine Joseph

► To cite this version:

Antoine Joseph. La mégaline/lrp2 exprimée dans le neuroépithélium antérieur est critique pour la croissance oculaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066144 . tel-01196100

HAL Id: tel-01196100

<https://theses.hal.science/tel-01196100>

Submitted on 9 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.

Ecole doctorale « Cerveau, Cognition, Comportement »

La mégaline/Irp2 exprimée dans le neuroépithélium antérieur est critique pour la croissance oculaire

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI
Spécialité : NEUROSCIENCES

Présentée et soutenue publiquement par :

Antoine JOSEPH

Le 20 Janvier 2015

Composition du jury :

Pr. Isabelle Ranchon-Cole
Dr. Vincent Soler
Pr. Muriel Umbhauer
Dr. Renata Kozyraki
Dr. Pierre Verroust

Rapporteur
Rapporteur
Présidente
Co-Directrice de thèse
Directeur de thèse

*Chacun de nous ignore la couleur de l'iris de presque tous ses amis.
L'oeil est regard : il n'est oeil que pour l'oculiste et pour le peintre.
André Malraux.*

Remerciements

Je remercie très sincèrement le Professeur José-Alain Sahel pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire d'excellence qu'est l'institut de la vision. Merci également à Sanofi-Fovea pour m'avoir soutenu financièrement au cours de mes trois ans de doctorat.

Merci au Pr. Isabelle Ranchon-Cole et au Dr. Vincent Soler d'avoir accepté le fastidieux travail de rapporteur, vos conseils et avis éclairés ont fait beaucoup pour ce manuscrit. Je remercie aussi le Pr. Muriel Umbhauer d'avoir accepté d'être le Président de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le Dr. Renata Kozyraki et le Dr Olivier Cases, leurs qualités scientifiques, leurs rigueurs leur connaissances et leurs méthodologies font d'eux de brillant chercheurs. Je vous remercie pour votre investissement sans relâche dans l'avancement de mon travail, Renata, je te remercie plus spécifiquement pour m'avoir fait confiance en me proposant un sujet de thèse passionnant et innovant au vu de mon peu d'expériences scientifiques à l'époque. Olivier, ton exigence m'a poussé à toujours corriger mes erreurs et à éviter l'impasse que je redoutais tant.

Je souhaite remercier le plus chaleureusement tous les personnes qui font l'IdV. Ceux avec qui j'ai partagé mon petit open-space : Martin, Sacha, Farah, Maria, Sandrine, Heike. Je vous remercie tous pour ces moments à refaire le monde (coupe du monde 2014 aidant) qui m'ont permis de m'évader un instant de la science.

Mais aussi « les filles d'à côté »: Julie, Katie, Laura, Chloé et Angélique. Julie pour tes conseils toujours avisés, ta bonne humeur sans faille et communicative, à toi je ne dirais qu'une chose « Limousin Power ». Katie et Laura je vous remercie pour votre sens de l'écoute, vos soutien et vos conseils qui m'ont éclairé. Chloé rien que pour ton rire qui m'a mainte fois transpercé le tympan gauche et ton pas lourd qui résonne jusqu'au rez-de-chaussé tu mérites ces quelques lignes de remerciement. Enfin le meilleur pour la fin, Angélique que l'on devrait canoniser pour m'avoir subi pendant ces trois ans et Dieu sait que c'est loin d'être facile. Je te remercie pour ton épaule et tes oreilles attentives mais aussi pour tes talents culinaires (par contre je ne te remercie pas pour les quelques kilos en trop). Nos chemins se séparent désormais mais je sais que j'y ai gagné une grande amie.

Enfin, ces quatre années passées à l'institut m'ont permis d'interagir avec différentes personnalités aussi diversifiées qu'enrichissantes. Je voudrais donc remercier toutes ces personnes. En commençant par Sylvie même si nos routes ne se sont croisées que très peu de temps je te remercie pour tous tes conseils et tes mises en garde, ton expertise en histologie mais c'est surtout pour ton aide, ton soutien et ta gentillesse sans faille que je te remercie. Viennent ensuite ces personnes qui ont gravité autour de moi dans cette galaxie qu'est le R+4. Merci à la planète « EqS2/S3/S4 » et à « la planète département développement » avec toutes ces personnes riche en diversités et en personnalités. Sans oublier la galaxie R+3 et la reine du cytomètre; Luisa. Merci pour ta gentillesse et ton humour.

A Luce, depuis le jour où tu m'as sauvé la vie lors de l'affaire du « Panier Yoplaitgate » j'ai pu apprécier ton humour et ta bonne humeur contagieuse. Je te remercie d'avoir été la, toujours forte en conseils et en avis objectifs. Pour ces discussions sans fin et ces parties de jeux géographique effrénées je te remercie sincèrement et chaleureusement.

A Sabine, dès le premier jour de mon arrivé tu m'as accueilli chaleureusement et rassuré. Tu as toujours été un soutien pour moi durant les jours difficiles et les périodes de doute, malgré nos personnalités différentes nous nous sommes trouvés. Pour ta bonté, ta générosité, ta gentillesse et j'en oublie certainement, ah oui ton tiramisu aux fruits rouges, je te remercie sincèrement et chaleureusement. Je ne sais pas ce que l'avenir me réserve mais si je suis arrivé jusqu'ici c'est grâce à toi Sabine, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Et je te rappelle que l'on doit se faire cette partie de pétanque ma chère.

A mes amis découvert durant mes années de fac, vous m'avez soutenu et conseillé pendant tout mon cursus. Même si ce noyau dur s'est éparpillé, parti au Québec ou à l'autre bout du monde et même dans la Seine et Marne, vous vous reconnaîtrez forcément dans ces quelques lignes. Je vous remercie de tout mon coeur et vous souhaite le meilleur, professionnellement et personnellement.

A ma famille, je tiens à vous remercier pour tout le soutien apporté durant ces années de thèse et les encouragements de la fin. Vous comptez énormément pour moi et cette thèse elle est aussi pour et de vous. A Biscotte, ma Lule et Papa, merci pour tous, je vous aime.

A miette, le dernier mais non le moindre. Tu as toujours été là pour moi et surtout dans les moments difficiles à me soutenir et me supporter surtout lors des ^{1/4}h interminables et de mes accès de colère. Ton soutien pendant ces années de thèse m'a été d'une grande aide et je t'en remercie profondément. Merci à toi de tout simplement croire en moi et en ma réussite. Je t'aime.

Table des matières

Liste des abréviations

Table des illustrations

AVANT-PROPOS

1ERE PARTIE: INTRODUCTION

I-Les récepteurs endocytiques multiligands: La mégaline/Irp2	2
I-1-La famille des récepteurs aux LDLs	2
I-1-1-La signalisation par les récepteurs aux LDLs	2
I-2-La mégaline/Irp2 : structure et ligands	4
I-2-1-Structure de la mégaline/Irp2	4
i-Domaine N-terminal	4
ii-Domaine C-terminal	6
I-2-2-Les ligands de la mégaline/Irp2	6
I-2-3-Les sites d'expression apicaux de la mégaline/Irp2	8
I-3-Fonction de la mégaline/Irp2	10
I-3-1-La mégaline/Irp2 comme récepteur endocytique	10
I-3-2-La mégaline/Irp2 et le développement embryonnaire	10
i-Expression embryonnaire chez la souris	12
I-4-Physiopathologie de la mégaline/Irp2	14
I-4-1-Le syndrome rénal de Fanconi	14
I-4-2-Le syndrome de Donnai-Barrow	16
I-5-Inactivation de la mégaline/Irp2 chez la souris	16
I-5-1-Inactivation constitutive	16
I-5-2-Inactivation conditionnelle	18
I-5-3-Les souris <i>FoxG1-Cre Meg^{L/L}</i>	18
 II-La myopie forte congénitale	 20
II-1-Généralités sur la myopie et la myopie forte	20
II-1-1-Définitions de la myopie	20
II-1-2-Prévalence de la myopie et de la myopie forte	20

II-1-3-Les mécanismes moléculaires à l'origine de la myopie forte	22
II-2-Formes syndromiques et facteurs génétiques	24
II-2-1-Formes syndromiques de la myopie forte	24
II-2-2-Facteurs génétiques impliquées dans la myopie forte	26
II-3-Facteurs environnementaux	30
II-4-Modèles animaux	32
II-4-1-Modèles mécanistiques	32
i-Modèles par défocalisation visuelle	32
ii-Modèles par privation visuelle	32
II-4-2-Modèles génétiques	36

1ERE PARTIE: RESULTATS

I-L'inactivation de la mégaline dans le cerveau antérieur reproduit fidèlement la myopie forte congénitale.	40
I-1-Introduction	40
I-1-Article	42
I-2-Discussion	44

2EME PARTIE: RESULTATS

I-Le corps ciliaire	48
I-1-Organisation structurale et cellulaire du corps ciliaire	48
I-2-Fonction du corps ciliaire	52
I-2-1-L'accommodation	52
I-2-2-La barrière hémato-aqueuse	52
i-Les jonctions serrées	54
ii-Les jonctions communicantes	54
iii-Les jonctions adhérentes	54
I-2-3-La synthèse de l'humeur aqueuse	56
II-Endocytose	58
II-1-Endocytose clathrine-dépendante	58
II-1-1-Protéines impliquées dans la formation des puits et des vésicules recouverts de clathrine	60

i-La clathrine	60
ii-L'adaptateur AP-2	60
iii-Les autres protéines adaptatrices et protéines accessoires	62
II-1-2-La régulation du trafic vésiculaire	64

RESULTATS

I-Analyse structurelle et fonctionnelle de la mégaline/lrp2 dans le corps ciliaire	68
I-1-Fonction de la mégaline/lrp2 sur la clairance des protéines plasmatiques	68
I-2-Conséquence de l'inactivation de la mégaline/lrp2 sur la structure de l'interface PE-NPE	72
I-3-Analyse immunomorphologique de l'épithélium ciliaire	74

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I-Myopie forte et mégaline/lrp2	82
II-Analyse de la chambre du vitré	86
III-Fonction de la mégaline/lrp2 dans l'internalisation des protéines plasmatiques au niveau de l'interface PE-NPE	87
IV-Analyse ultrastructurale de l'interface PE-NPE	88
V-Analyse moléculaire de l'interface PE-NPE	90

BIBLIOGRAPHIE 94

ANNEXE

I-Matériels et méthodes	120
I-1-Injection des protéines fluorescentes	122
I-2-Immunomarquage	122
i-Immunohistochimie	122
ii-Duolink	122
I-3-Co-immunoprécipitation	122
II-L'oeil	124
II-1-Description générale de l'oeil	124
II-2-La rétine	126
II-2-1-Organisation structurale et cellulaire de la rétine	126
II-2-2-Fonction de la rétine	132

Liste des Abréviations

Alb	Albumine
Ap	Autophagosome
ApoER2	Apolipoprotein E receptor 2
AqH	Aqueous humor
ARH	Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
Brn3a	Brain-specific homeobox domain protein 3A
C	Cristallin
cap	Capillaire
cc	canal ciliaire
ccl	Corps ciliaire
Ccr	Corps cellulaire des photorécepteurs
CCr	Courbure de la cornée
Ch	Choroïde
ChA	Chambre antérieure
ChP	Chambre postérieure
Circ	Circonférence
Cr	Cornée
CRE	Cyclization recombinase
CV	Chambre vitrée
Cx-43	Connexine-43
D	Dioptries
Dab-1	Disabled-1
Dab-2	Disabled-2
DB	Donnai-Barrow syndrom
DE	Diamètre à l'équateur
Di	Dilatation
EC	Epaisseur du cristallin
Eea1	Early Endosome Antigen 1
EGF	Epidermal growth factor
ERG	Electrorétinogramme
EScl	Eperon du canal de Schlemm
FOAR	Facio-oculo-acoutisco-renal syndrom
FoxG1	Forkhead box protein G1
GABA	Gamma-aminobutyric acid
gcl	Ganglion cell layer

GFAP	Glial fibrillary acidic protein
ICM	Inner cell mass
igj	Invaginated junctions
inl	Inner nuclear layer
IOP	Intraocular pressure
ipl	Inner plexiform layer
Ir	Iris
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LA	Longueur axiale
Lamp1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LCA	Longueur de la chambre antérieure
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
LRP2	Lipoprotein receptor-related protein 2 (mégaline)
Mc	Muscle ciliaire
Meg	Mégaline
nbl	Neuroblastic layer
NO	Nerf optique
NPE	Non pigmented epithelium
onl	Outer nuclear layer
opl	Outer plexiform layer
OTX2	Orthodenticle homeobox 2
PA	Plasminogen activator
PAI	Plasminogen activator inhibitor
Pax6	Paired box 6
PCA	Profondeur de la chambre antérieur
PCV	Profondeur de la chambre vitrée
PE	Pigmented epithelium
PEd	Parietal endoderm
pH3	Phospho-histone H3
PKC α	Protein kinase C α
PNA-L	Lectin PNA
Pr	Proces ciliaire
PrE	Primitive endoderm
PTB	Phosphotyrosine-binding domain
R	Rétine
RAP	Ras-related protein
Rho	Rhodopsin

rn	rétine neurale
RPE	Retinal pigment epithelium
s	Stroma
Scl	Sclère
Scl	Sclérotique/Sclère
SE	Segment externe des photorécepteurs
SHH	Sonic hedgehog
SI	Segment interne des photorécepteurs
SScl	Canal de Schlemm
Syn	Synapse
Tbr2	T-box transcription factor Eomes
TE	Trophoblast
tjc	Tight junctions
Tr	Réseau Trabeculaire
Tuj1	β 3 Tubulin
VE	Visceral endoderm
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLR	Very low density lipoprotéine receptor
Wnt1	Wingless-type 1
Zo	Fibres zonulaire
ZO-1	Zona occludens-1

Table des illustrations

INTRODUCTION

Figure 1 :	La super-famille des récepteurs aux LDLs	3
Figure 2 :	La mégaline/lrp2 pendant le développement précoce de l'embryon	11
Figure 3 :	Expression de la mégaline/lrp2 dans l'oeil en développement	13
Figure 4 :	Le syndrome Donnai-Barrow	15
Figure 5 :	Le modèle de souris <i>FoxG1-Cre Meg^{L/L}</i>	17
Figure 6 :	L'oeil et la vision du myope	19
Figure 7 :	Prévalence de la myopie et de la myopie forte à travers le monde	21
Figure 8 :	Collagénopathie et myopie forte: le syndrome de Stickler	23
Figure 9 :	Les modèles animaux de myopie par défocalisation visuelle	31
Figure 10 :	Les modèles animaux de myopie par privation visuelle	33
Figure 11 :	Le poisson zèbre <i>Bugeye</i>	35
Figure 12 :	Coupe sagittale du corps ciliaire humain	47
Figure 13 :	Structure de l'épithélium ciliaire	49
Figure 14 :	Différentes jonctions cellulaires dans l'épithélium ciliaire	53
Figure 15 :	L'angle iridocornéen et les structures associées	55
Figure 16 :	La mégaline/lrp2 dans l'endocytose	57
Figure 17 :	Formation des vésicules recouvertes de clathrine	59
Figure 18 :	Démantèlement des vésicules recouvertes de clathrine	61
Figure 19 :	Régulation du trafic endocytaire	63
Tableau 1 :	Les ligands de la mégaline	5
Tableau 2 :	Sites d'expression de la mégaline	7
Tableau 3 :	Loci de successibilité à la myopie forte	27

RESULTATS

Figure 1 :	Expression de la mégaline dans l'épithélium du corps ciliaire	67
Figure 2 :	La mégaline et le processus endocytique dans le corps ciliaire	69
Figure 3 :	Désorganisation morphologique du corps ciliaire des souris <i>FoxG1-Cre Meg^{L/L}</i>	71
Figure 4 :	Inactivation de la mégaline et mise en place des jonctions serrées et communicantes	73
Figure 5 :	Redistribution des protéines des jonctions adhérentes	75
Figure 6 :	La mégaline et la jonction adhérente	77

DISCUSSION

Figure 1 :	Mécanisme moléculaire supposé de formation des jonctions adhérentes	89
Figure 2 :	Inactivation de la mégaline/Irp2 et endocytose des cadhérines	91

ANNEXE

Figure 1 :	Coupe sagittale horizontale de l'oeil humain adulte	123
Figure 2 :	Organisation stratifiée de la rétine	125
Figure 3 :	Illustration de la morphologie des Cônes et des Bâtonnets	127
Figure 4 :	Diversité des sous-types cellulaires de la rétine	129
Figure 5 :	Organisation centro-périphérique de la rétine	131
Figure 6 :	Les afférences du nerf optique	133
Tableau 1 :	Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie	121

AVANT-PROPOS

La mégaline/Lrp2 est un récepteur endocytaire transmembranaire multiligand de 600kDa. Elle est exprimée à la membrane apicale de plusieurs épithéliums absorbants, notamment ceux du rein et de l'intestin. Dans l'œil elle est exprimée au niveau de l'épithélium ciliaire et de l'épithélium pigmentaire rétinien (Assémat et al., 2005b). Elle est importante pour la réabsorption rénale de nombreux ligands, dont des protéines sériques, des enzymes et des médicaments. Au cours du développement la mégaline est impliquée dans la morphogenèse du télencéphale où elle contribue à la dégradation de BMP4 (Spoelgen et al., 2005) et à la signalisation de SHH (McCarthy et al., 2002 ; Christ et al., 2012). Chez l'homme, des mutations de la mégaline ont été caractérisées chez des patients atteints du syndrome de Donnai-Barrow, caractérisé, entre autres, par une agénésie du corps calleux, une protéinurie, une hernie diaphragmatique, des troubles de l'audition et une myopie forte (Pober et al., 2009).

Pour étudier le rôle de la mégaline/Lrp2 dans le développement de l'œil nous avons généré des souris conditionnelles inactivées pour la mégaline/Lrp2 spécifiquement dans le prosencéphale (souche *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*). Le prosencéphale antérieur est la structure embryonnaire qui donne naissance au télencéphale et au diencephale, dont l'œil (rétine, épithélium pigmentaire, corps ciliaire et iris) dérive.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été la caractérisation détaillée du phénotype oculaire des souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}* (Joseph et al., 2014; *soumis*). Le deuxième objectif a été l'étude de la fonction de la mégaline dans le corps ciliaire. Nous montrons que la mégaline contribue à l'endocytose dégradative des protéines plasmatiques présentes au niveau de l'interface des épithéliums pigmentaire et non-pigmentaire du corps ciliaire

Ce modèle génétique nous permettra de mieux comprendre la pathogenèse de la myopie forte, comme celle détectée chez les patients Donnai-Barrow. Le rôle de la mégaline comme récepteur endocytaire contribuant à la fonction de l'épithélium ciliaire ouvre de nouvelles perspectives quant à la modulation de la fonction de cette structure au cours des pathologies oculaires telles que la myopie ou le glaucome.

1^{ERE} PARTIE: INTRODUCTION

I-Les récepteurs endocytiques multiligands: La mégaline/Lrp2

La mégaline/Lrp2, identifiée en 1982 comme l'antigène de la néphrite de Heymann (Kerjaschi et al., 1982; Kerjaschi et al., 1983), est un récepteur endocytique qui appartient à la famille des récepteurs aux lipoprotéines à faible densité (LDLRs) (Moestrup et al., 1994; Saito et al., 1994; Marzolo & Farfán, 2011)

I-1-La famille des récepteurs aux LDLs

Cette famille comporte aussi: les VLDLRs, apoER2 et les LRP (Hussain et al., 1999) (Figure 1). Tous les membres de la famille des récepteurs aux LDLs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I ayant en commun un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Le domaine extracellulaire contient des motifs de classe A, de classe B et le domaine intracellulaire, des signaux d'internalisation NPXY (Krieger et al., 1994; Schneider et al., 1997) (Figure 1).

En présence de Ca^{2+} , tous les membres de la famille lient une multitude de ligands extracellulaires. Dans la majorité des cas les ligands sont destinés à une voie lysosomale. Tous les récepteurs sont aussi capables de lier la Receptor Associated Protein (RAP). Située dans le réticulum endoblastique cette protéine de 40 kDa intervient comme protéine chaperonne dans la biosynthèse des récepteurs des LDLs. Sa liaison empêcherait toutes liaisons prématurées des récepteurs avec des ligands intracellulaires (Willnow et al., 1996a). L'invalidation du gène de la RAP chez la souris s'accompagne d'une réduction significative de l'expression des LDLRs à la membrane (Birn et al., 2000).

I-1-1-La signalisation par les récepteurs aux LDLs

Alors que la fonction première du LDLR est l'internalisation des LDLs (Figure 22), des études ont révélé des séquences dans les domaine cytoplasmique de ces récepteurs, à l'origine d'interactions avec des protéines intracellulaires induisant les cascades de signalisation (Jen et al., 2010; Weekes et al., 2012). Ces récepteurs sont donc à la fois impliqués dans l'endocytose mais aussi dans différentes voies de signalisation qui peuvent être physiopathologiques comme le cancer (Wang et al., 2004; Langlois et al., 2010), la maladie d'Alzheimer (Bu, 2009) ou encore l'athérosclérose (Yancey et al., 2011). La présence des motifs NPxY dans la partie cytoplasmique des LDLRs permet une

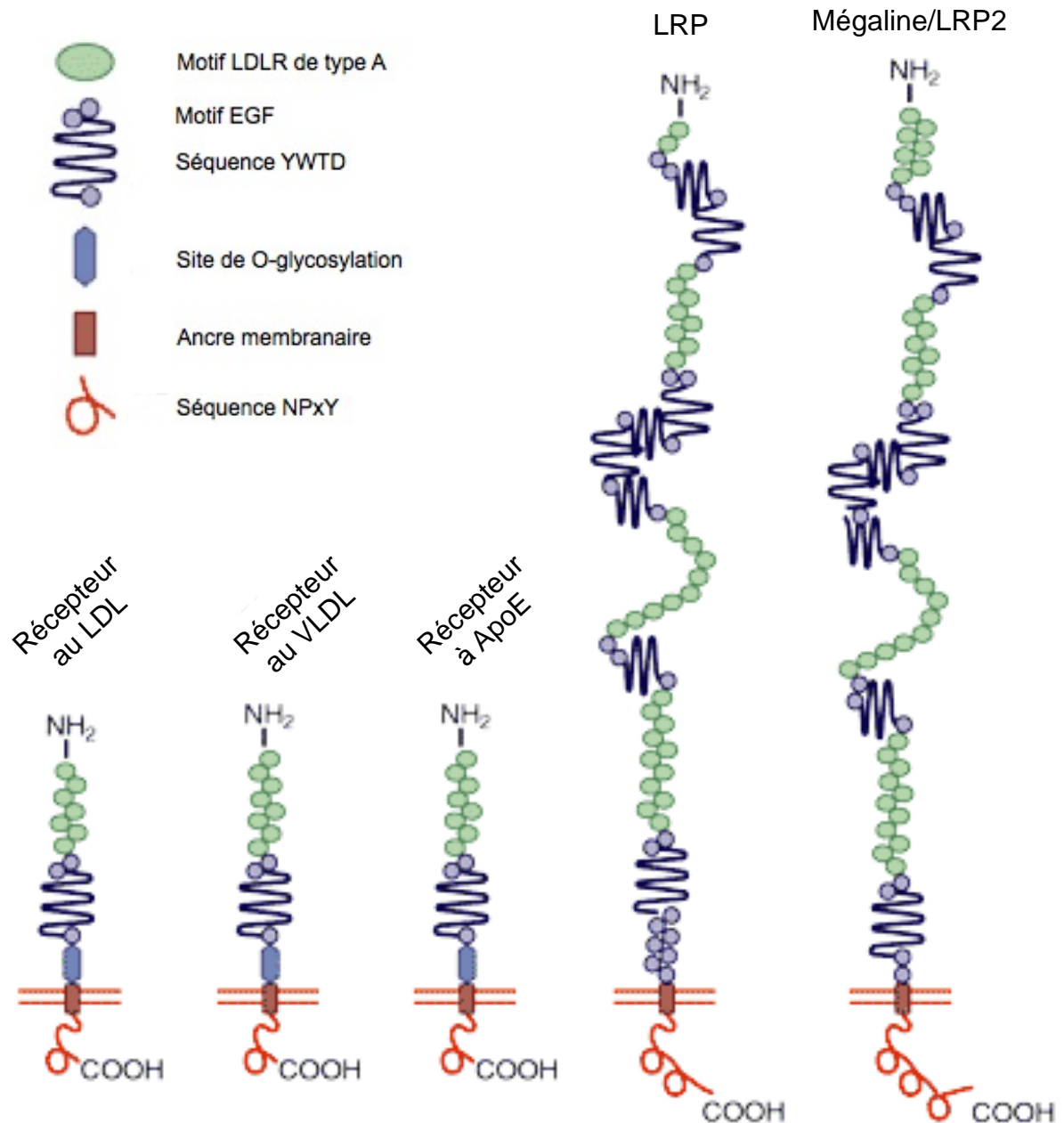


Figure 1 : La super-famille des récepteurs aux LDLs.

Schéma représentant les différentes structures des membres de la famille des LDLRs. *Adapté de Willnow et al., 1999.*

interaction avec des protéines adaptatrices (Figure 1), en particulier celles présentant des domaines de phosphotyrosine (PTB) (Ravichandran et al., 1997). L'interaction des membres de la famille des LDLRs avec des protéines adaptatrices les implique dans des voies de signalisation et d'endocytose. Les protéines disabled-1 (Dab-1), et disabled-2 (Dab-2) ont des domaines PTBs et interagissent avec la mégaline/lrp2 (Trommsdorff et al., 1998). Elles se lient à ces récepteurs via leur motif PTB (Yun et al., 2003). Dab-2 a toujours été impliqué dans le processus d'endocytose (Gotthardt et al., 2000). Cette protéine peut interagir soit avec le récepteur de la famille du LDLR, mais elle peut aussi via ses motifs NPF et DPF, interagir avec la protéine accessoire AP-2. Cette dernière interaction indique qu'elle joue un rôle important dans la formation et la régulation des vésicules d'endocytose recouvert de clathrine (Chetrit et al., 2009; Teckchandani et al., 2012). Dab-1 quant à lui participe à une voie de signalisation via l'activation du récepteur aux lipoprotéines à très faible densité (VLDLRs) et à celui de l'apolipoprotéine E. Dans les neurones corticaux, Dab-1 est phosphorylée sur ses tyrosines en réponse à la liaison de la reeline (Hiesberger et al., 1999 ; Fuchigami et al., 2013). Une fois Dab-1 activée, des signaux dans les neurones permettent la régulation de la migration neuronale (Feng et Cooper, 2009).

I-2-La mégaline/lrp2: structure et ligands

I-2-1-Structure de la mégaline/lrp2

La mégaline/lrp2 est une protéine conservée dans le règne animal. Chez l'homme, la localisation de la mégaline/lrp2 est 2q31.1 (Kortenberget al., 1994). La séquence de la mégaline/lrp2 comporte 4660 acides aminés formant ainsi pour une protéine d'environ 600 kDa (Christensen et Verrous, 2002). La mégaline/lrp2 est organisée en une région de 25 résidus amino-terminaux suivie d'une région extracellulaire de 4400 acides aminés, d'une région transmembranaire de 22 acides aminés et enfin d'un domaine cytoplasmique C terminale de 213 acides aminés (Figure 1).

i-Domaine N-terminal

Le domaine extracellulaire contient trois grands types de motifs :

Le premier consiste en la répétition de 36 motifs de classe A avec une alternance de sept, huit, dix et onze motifs contigus. Cette succession de motifs est caractérisée par la présence de six cystéines qui forment entre elles des ponts disulfures (Bieri et al., 1998;

Protéines liant des vitamines	RBP DBP Transcobalamine-vitamine B12	
Protéines de transport	Albumine Transthyretine Lactoferrine	
Lipoprotéines	Apolipoprotéine B Apolipoprotéine E	Apolipoprotéine J (Clusterin) Apolipoprotéine H
Hormones et précurseurs	Insuline Hormone parathyroïdienne EGF	Prolactine Thyroglobuline
Drogues et toxines	Aminoglycosides Polymyxine B	Aprotinine Trichosanthine
Enzymes et inhibiteurs	PAI-1 PAI-1-urokinase PAI-1-tPA Pro-urokinase	Lipoprotéine lipase Plasminogène β-amylase lysozyme
Protéines de stress et immunes	Chaines légères d'immunoglobuline PAP-1 β ₂ -microglobulin	
Autres	RAP Ca ²⁺ Cytochrome c	

Tableau 1 : Les ligands de la mégaline/Irp2.

Tableau listant les différents ligands de la mégaline. *Adapté de Verroust & Kozyraki, 2003.*

Bieri et al., 1995), mais aussi différents aminoacides chargés négativement. La série de huit motifs de classe A comportent les sites de liaison pour certains ligands, comme l'apolipoprotéine E, la lipoprotéine lipase ou la RAP (Orlando et al., 1993) (Figure 1).

Le deuxième grand type de motif est le motif de type B2 (EGF). On en dénombre seize à des positions plus au moins contigus ou espacés. Lorsque les motifs sont espacés ce sont des tetrapetides YWTD qui sont intercalés entre les motifs de type B2. Comme pour les motifs de classe A on retrouve dans ces motifs des cystéines. Certains de ces motifs sont impliqués dans la liaison au ligand (Moestrup et al., 1993; Willnow et al., 1994). Le dernier motif de type B2 et les derniers tripeptides YWTD accélèrent la dissociation ligand/récepteur (Davis et al., 1987) (Figure 1).

Enfin le dernier type de motif est celui de type B1 (type EGF). Il est juxta-membranaire.

Toute cette région extracellulaire contient quarante deux sites de N-glycosylation mais contrairement aux autres membres de la super-famille des LDLRs aucun site de O-glycosylation n'est présent dans la mégaline/lrp2 (Willnow et al., 1999). Sa fonction est peu connue.

ii-Domaine C-terminal

La région cytoplasmique contient deux motifs de type NPXY (Saito et al., 1994) et un motif VENQNY de type NPxY (Figure 1). Le premier et le troisième motifs NPXY sont indispensables à l'efficacité de l'endocytose clathrine dépendante, le deuxième motif est impliqué dans la signalisation et est critique pour l'adressage apicale (Marzolo et al., 2003; Takeda et al., 2003). La mégaline/lrp2 possède aussi dans cette région des motifs du type SH3 et des motifs du type YxxØ, et enfin des motifs PDZ (Hjalm et al., 1996). Des techniques de double hybride, réalisées par Oleinikov, ont permis de mettre en avant l'interaction entre la mégaline/lrp2 et plusieurs adaptateurs cytoplasmique comme dab-1 et dab-2 (Oleinikov et al., 2000). Cette liaison se situe au niveau du troisième motif NPxY du domaine cytoplasmique (Gallagher et al., 2004). Ces différents motifs sont indispensables pour la liaison aux protéines adaptatrices, qui vont permettre la mise en place des mécanismes de l'endocytose, comme AP-2 et la mise en place des vésicules endocytiques (Stolt et Bock, 2006).

I-2-2-Les Ligands de la mégaline/lrp2

Des études biochimiques ont montré que la mégaline/lrp2 et lrp1 ont en commun la plupart de leurs ligands (Tableau 1). Cette similitude est due à la forte homologie qui existe entre la structure des lrp1 et celle de la mégaline/lrp2. Il est difficile de détailler tous les

Intestin	
Iléon	(Mégaline) ++
Rein	
Tubule proximal	
Cellules épithéliales du glomérule	+++
Cellules mésangiales du glomérule	+
	-
Foie	
Hépatocytes	-
Cellules de Kupffer	-
Poumon	
Pneumocytes de type II	++
Coeur	
	-
Appareil génital mâle	
Testicules/Spermatides	-
Tubes efférents	+++
Epididyme	+++
Canal déférent	++
Appareil génital femelle	
Couche germinale de l'ovaire	++
Cellules folliculaires de l'ovaire	-
Epithélium de l'endomètre	+++
Oviducte	++
Glande mammaire	
Epithélium canalaire	+
Placenta	
Trophoblastes	+
Mésenchyme foetal	-
Sac vitellin	+++
Glandes endocrines	
Thyroïde	++
Parathyroïde	+++
Cortex surrénal	-
Système nerveux central	
Plexus	+
Ependyme	++
Neurones	+
Astrocytes	-
Oeil	
Epithélium ciliaire	+++
Epithélium pigmentaire rétinien	+
Rétine	-
Cornée	-
Oreille interne	+++

Tableau 2 : Sites d'expression de la mégaline/Irp2.

Tableau listant les différents sites d'expression de la mégaline chez l'adulte.
Adapté de Verroust & Kozyraki, 2003.

les nombreux ligands de la mégaline/lrp2. Le calcium est indispensable à la liaison de la totalité des ligands.

En effet, il induit des modifications dans la conformation des motifs de type EGF (Daly et al., 1995) permettant une exposition directe des autres sites de liaison. De plus, la forte interaction qu'il existe entre le récepteur et son ligand est due à l'action synergique de plusieurs des motifs de la région extracellulaire, de la mégaline/lrp2. D'autres molécules sont liées et internalisées par la mégaline/lrp2, dans différents tissus; Les apolipoprotéines E et J/ Clusterine (Kounnas et al., 1995; Morales et al., 1996; Zlokovic et al., 1996; Hammad et al., 2000; Christfforsen et al., 2006). Des molécules de signalisation; l'angiotensine 1, 2 et 7 (Gonzales-Villalobos et al., 2005; Gonzales-Villalobos et al., 2006), la leptine (Hama et al., 2004; Dietrich et al., 2008), l'insuline (Orlando et al., 1998), des protéines de liaison des vitamines; la vitamine D, A et B12, leur protéine de liaison (Christensen & Willnow, 1999).

I-2-3-Les sites d'expression apicaux de la mégaline/lrp2

Dans le rein La mégaline/lrp2 est exprimée au pôle apical des cellules épithéliales qui bordent le tube proximal contourné (Lundgren et al., 1997; Zheng et al., 1994; Assmann et al., 1986) (Tableau 2). Elle est aussi exprimée par les cellules du sac vitellin (Burke et al., 2013) (Assémat et al., 2005).

Dans le système nerveux central, l'expression de la mégaline/lrp2 est restreinte au plexus choroïdien (Chun et al., 1999; Carro et al., 2005), aux cellules épendymaires des ventricules latéraux (Gajera et al., 2010), et dans la moelle épinière (Wicher et al., 2006). L'expression de la mégaline/lrp2 a été aussi décrite dans les organes sensoriels; l'oreille interne (Mizuta et al., 1999; König et al., 2008). Dans l'oeil la mégaline/lrp2 est exprimée au niveau de l'épithélium du corps ciliaire et aussi dans l'épithélium pigmentaire rétinien (Lundgren et al., 1997; Assémat et al., 2005; Fisher & Howie, 2006). Le profil d'expression est conservé chez l'homme (Lundgren et al., 1997) (Tableau 2).

I-3-Fonction de la mégaline/lrp2

I-3-1-La mégaline/lrp2 comme récepteur endocytaire

La structure peptidique de la mégaline/lrp2 suggère que cette protéine a une fonction de récepteur endocytaire. Il a été montré que la mégaline/lrp2 permettait l'internalisation, suivie par une dégradation dans des lysosomes, de la protéine RAP dans le rein (Christensen et al., 1992). Le rôle de la mégaline/lrp2 dépend du ligand auquel elle est exposée (Dickson et al., 2014; Chun et al., 2014). La fonction de la mégaline/lrp2 dans le rein est clairement établie, elle intervient dans la capture des molécules filtrées au niveau du tubule proximal (Leheste et al., 1999; Leheste et al., 2003) et est impliquée dans diverses fonctions biologiques comme par exemple le transport des vitamines, l'activité de protéinases extracellulaires, et le métabolisme lipidique (Marzolo et Farfan., 2011). Elle joue un rôle dans l'homéostasie de la vitamine B12 en facilitant son internalisation dans l'intestin et sa réabsorption par le tube contourné proximal du rein (Kozyraki & Cases, 2013; Jensen et al., 2014). La mégaline/lrp2 est aussi un récepteur clé des protéines qui passent le filtre glomérulaire, indispensable à leur clairance (Gburek and al., 2002) (De et al., 2014).

Le rôle majeur de la mégaline/lrp2 a été confirmé *in vivo* ; des études sur les patients Donnai-Barrow, qui portent des mutations sur le gène codant pour la mégaline/lrp2, ont montré une protéinurie et des problèmes structuraux dans le rein (Nielsen et al., 2007). Les mêmes observations ont été faites chez les souris déficientes en mégaline/lrp2 (Leheste et al., 1999).

Récemment il a été montré que la mégaline/lrp2 est impliquée dans l'homéostasie du sélénium (Chiu-Ugalde et al., 2010).

I-3-2- La mégaline/lrp2 et le développement embryonnaire

La mégaline/lrp2 est importante durant l'embryogenèse (Gerbe et al., 2008). Elle est probablement impliquée dans l'internalisation du cholestérol et/ou des folates par le sac vitellin (Assémat et al., 2005), et le neuroépithélium (Drake et al., 2004; Kur et al., 2014).

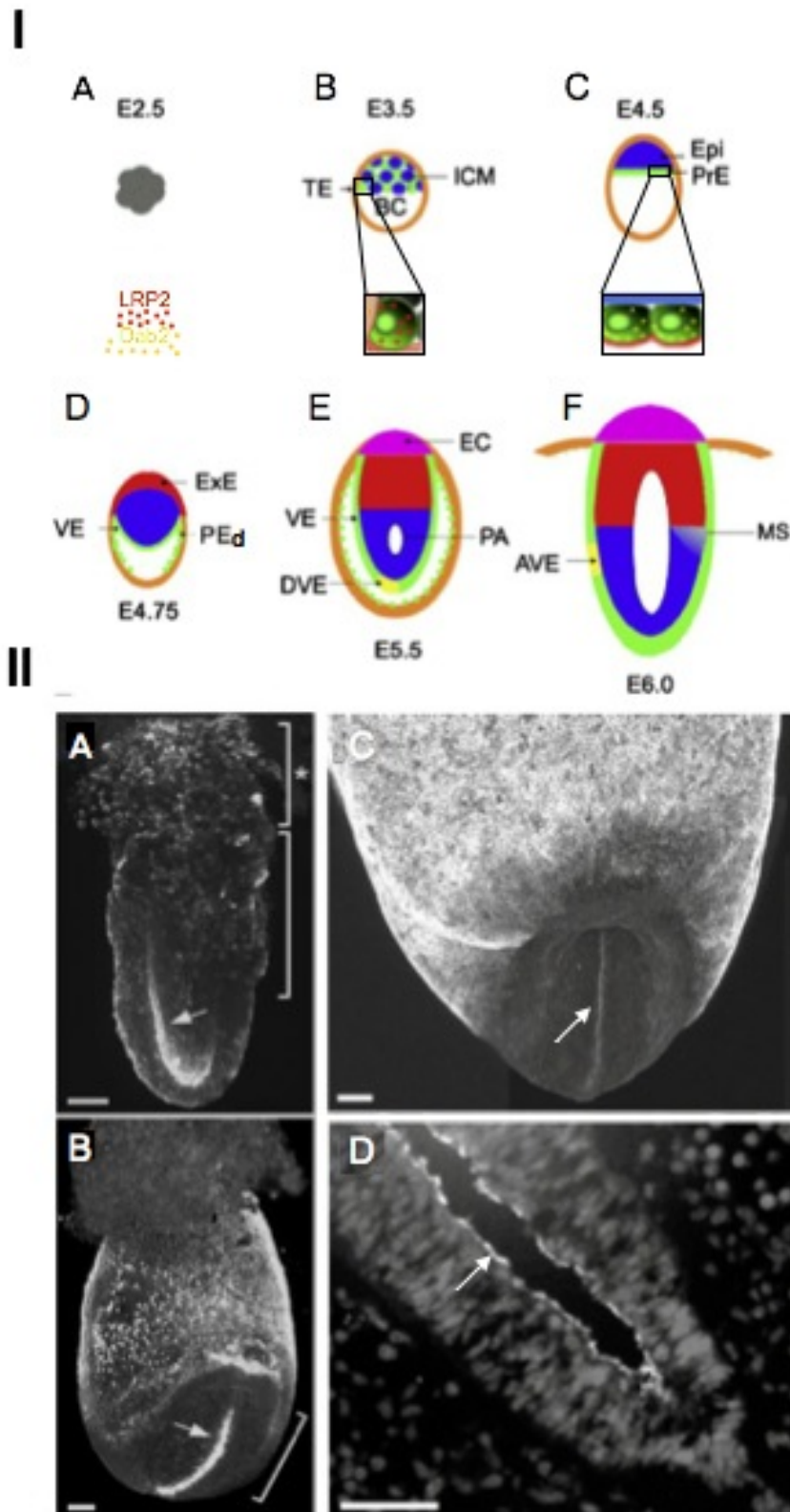


Figure 2 : La mégaline/Lrp2 pendant le développement précoce de l'embryon.

(I) Schéma représentant la localisation de la mégaline (point rouge) dans l'embryon à E2.5 (A), E3.5 (B), E4.5 (C) E4.75 (D) E5.5 (E) E6.0 (F). TE (Trophectoderme) ICM (Masse cellulaire interne) BC (Blastocyste) Epi (Epiblaste) PrE (Endoderme primitif) ExE (Ectoderme extraembryonnaire) PE_d (Endoderme pariétal) VE (Endoderme viscéral) DVE (Endoderme viscéral distal) PA (Cavité préamniotique) EC (cône ectoplacentaire) MS (Mésendoderme) AVE (Endoderme viscéral antérieur). *Adapté de Gerbe et al., 2008*

(II) Immunohistochimie anti-mégaline (flèches) à E6 (A), E7,5 (B) et E8.5 (C,D). *Drake et al., 2004.*

i-Expression embryonnaire chez la souris

Au cours du développement embryonnaire la mégaline/lrp2 est exprimée dans quatre structures; 1./ La masse cellulaire interne (ICM) et le trophoctoderme (TE), 2./ L' endoderme viscéral (VE), 3./ Le neuroectoderme, 4./ Les crêtes neurales.

En 2005, Assémat et coll. ont montré que la mégaline/lrp2 était exprimé au niveau de l'ICM et du TE (Gerbe et al., 2008) (Figure 2 I, B). Cette expression de la mégaline/lrp2 dans l'embryon coïncide avec une activité endocytyque intense.

Peu de temps avant l'implantation les cellules de l'ICM se différencient pour former l'endoderme primitif (Figure 2 I, C, PrE). Ce feuillet exprime la mégaline/lrp2 au niveau de l'appareil endocytyque apical. La mégaline/lrp2 est aussi présente dans les structures qui en dérive; l'endoderme viscéral (Figure 2 I, D, VE) et endoderme pariétal (Figure 2 I, D, PEd) (Sahali et al., 1988; Kalantry et al., 2001). Sa présence dans ces structures participerait à la croissance de l'embryon via une endocytose et/ou transcytose des nutriments maternels, tels que les vitamines et les lipides. Cette endocytose serait Dab-2 dépendante (Strope et al., 2004).

Après la gastrulation son expression persiste seulement au niveau de l'endoderme et du neuroectoderme (Figure 2 II, A). Durant la neurulation, elle est retrouvée dans les cellules neuroépithéliales et les placodes sensorielles (Figure 2 II) (Drake et al., 2004). Ensuite son expression se restreint progressivement à la zone ventriculaire du tube neural ventral. Ainsi la mégaline/lrp2 n'est détectée que dans la région ventrale des quatre ventricules du cerveau (Assémat et al., 2005).

Dans le neuroépithélium (Figure 2 II, C et D), elle joue un rôle dans la formation des structures du cerveau (Willnow et al., 1996; Spoelgen et al., 2005; Wicher et al., 2005). En effet, il existe une relation fonctionnelle entre la mégaline/lrp2 et le morphogène *Shh*, jouant le rôle de récepteur auxiliaire, il se lie à la mégaline/lrp2 avec une très haute affinité et cette interaction est résistante à la dissociation lysosomale (McCarthy et al., 2002). Il en est de même pour le morphogène *BMP4*, où la mégaline/lrp2 aurait un rôle de récepteur de clairance (Spoelgen et al., 2005). Enfin la mégaline/lrp2 est détectée dans les crêtes neurales céphaliques où elle permettrait indirectement l'internalisation de *Fgf8*, un morphogène nécessaire à la survie de ces cellules (Cases et al., 2013).

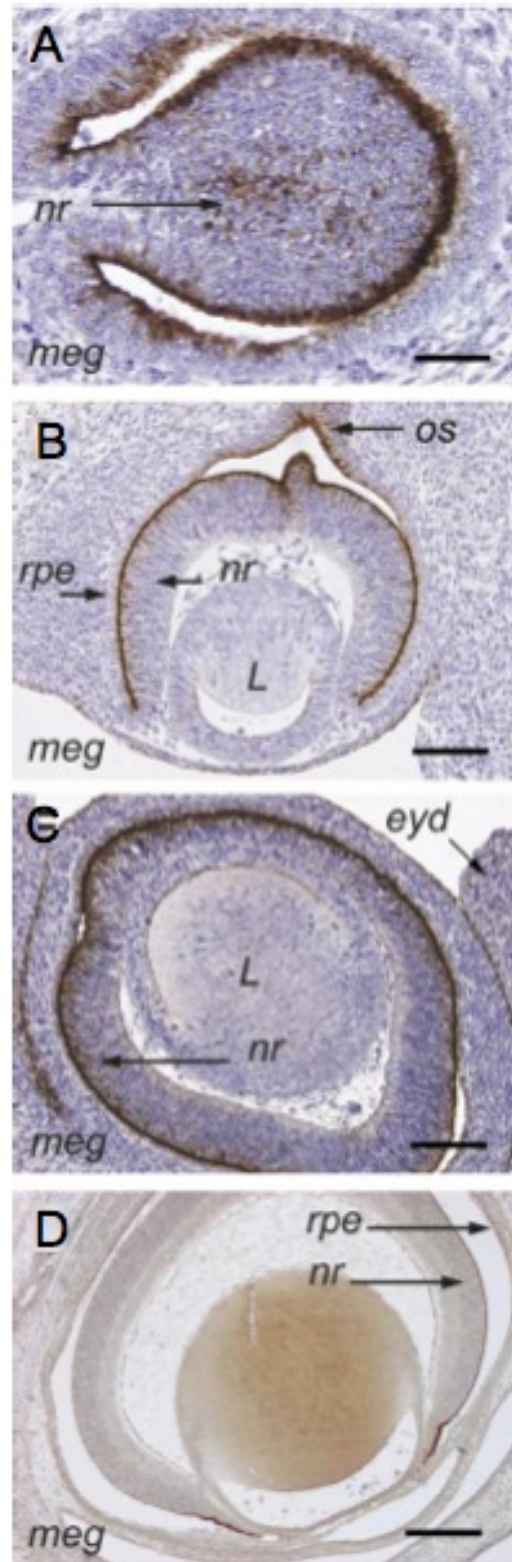


Figure 3 : Expression de la mégaline/lrp2 dans l'oeil en développement.

Marquage mégaline sur des coupes sagittales de l'oeil de souris à E11 (A), E12 (B), E14 (C), et E18 (D). meg (Mégaline), nr (Rétine neurale), os (Nerf optique présumé), rpe (Epithélium pigmentaire rétinien), L(Cristallin), eyed (Paupière). *Adapté de Assémat et al., 2005.*

Dans le système visuel la mégaline/lrp2 est exprimée dans la vésicule optique (Figure 3 A) au niveau de la couche interne, et externe de la cupule optique (Figure 3 B), puis son expression se restreint au cours du développement (Figure 3 C) au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien et la région présomptive de l'épithélium ciliaire (Figure 3 D) (Assémat et al., 2005).

I-4-Physiopathologie de la mégaline/lrp2

La mégaline/lrp2 est impliquée dans la pathogenèse de la protéinurie dans plusieurs syndromes.

I-4-1-Le syndrome rénal de Fanconi

Chez l'homme, le syndrome rénal de Fanconi consiste à un dysfonctionnement généralisé du tubule proximal dans le rein qui conduit à une altération de la réabsorption protéique (protéinurie) (Bergeron et al., 2001). La maladie de Dent (Thakker, 2000; Lloyd et al., 1996), le syndrome oculo-cerebro-rénal de Lowe (Lowe et al., 1952) et le syndrome idiopathique autosomal dominant (Brenton et al., 1981) sont des exemples du syndrome rénal de Fanconi. Bien que pléiotropiques, tous présentent un défaut dans la réabsorption protéique au niveau du tubule proximal (Thakker, 2000). La maladie de Dent est due à une mutation sur le gène CLCN5 qui code pour une protéine constituant le canal chlorure, empêchant toute formation de compartiments endosomaux dans les cellules du tubule proximal (Günther et al., 1998). Le syndrome autosomal récessif de Fanconi est dû à une altération du mécanisme de réabsorption des molécules à faible poids moléculaires dans le tubule proximal (Norden et al., 2002). La réduction de l'expression de la mégaline/lrp2 dans le tubule proximal serait probablement due à un défaut d'acidification des endosomes et de son recyclage membranaire. Les observations ci-dessus soulignent l'importance de la Mégaline/lrp2 dans la pathogenèse de la protéinurie associée avec ces maladies (Piwon et al., 2000; Norden et al., 2002).

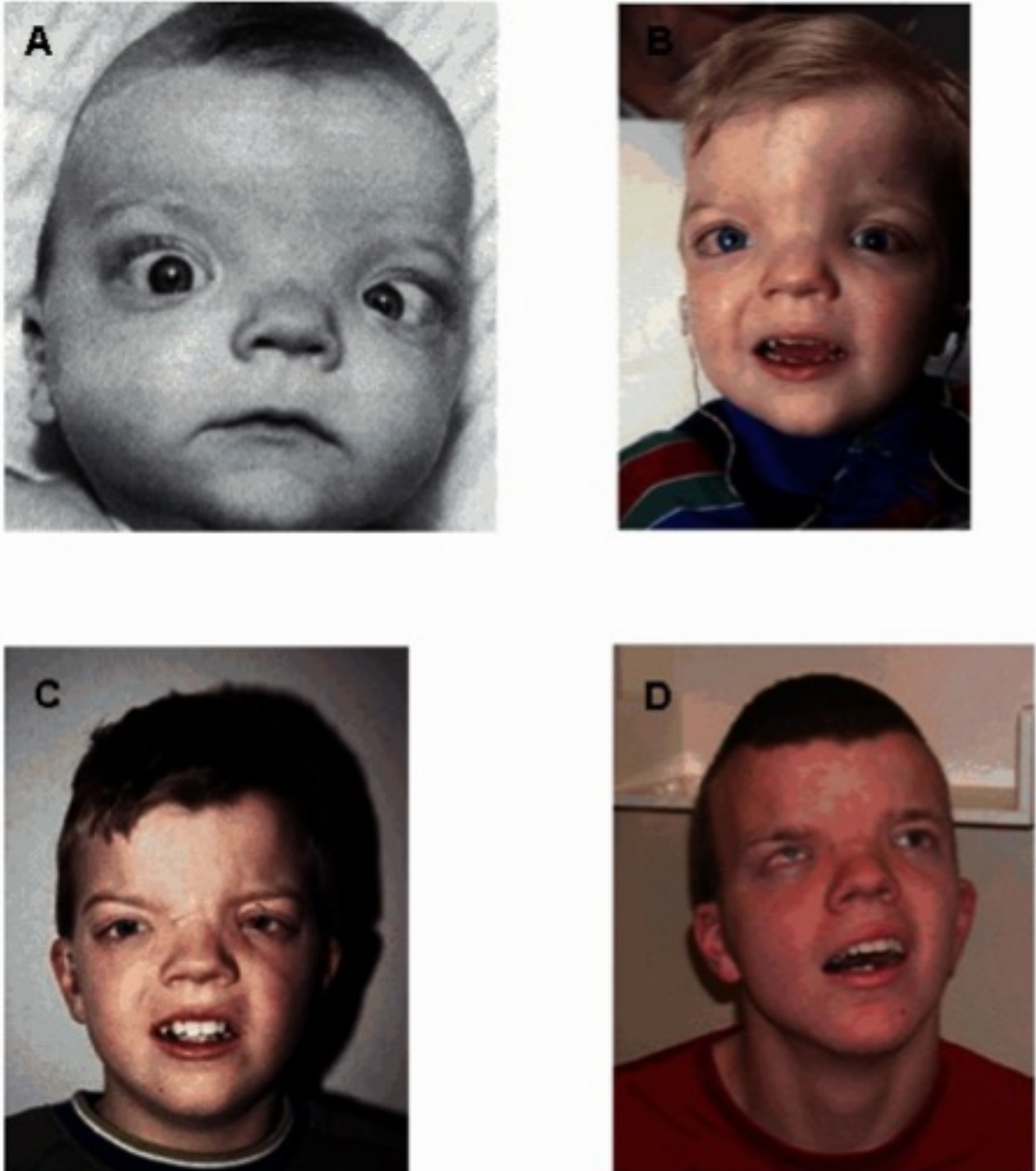


Figure 4 : Le syndrome de Donnai-Barrow.

Photographie d'un patient atteint du syndrome de Donnai-Barrow à six mois (A) 2ans1/2 (B) 8 ans (C) et 19 ans (D). *Kantarci et al., 1993*

I-4-2-Le syndrome de Donnai-Barrow

Chez l'homme, des mutations sur le gène codant pour la mégaline/lrp2 sont à l'origine du syndrome, autosomal récessif, de Donnai-Barrow (Donnai & Barrow, 1993) (Figure 4). Ces mutations non-sens, faux-sens et de décalages du cadre de lecture, affectent le domaine extracellulaire de la mégaline/lrp2, aboutissant à une perte de fonction de la protéine (Kantarci et al., 2007). Le syndrome de Donnai-Barrow ou syndrome Facio-Oculo-Acoustico-Renal (DB/FOAR) (Kantarci et al., 2007), est une pathologie rare caractérisée par une série de malformations (Pober et al., 2009). Ces anomalies sont congénitales; hypertélorisme, partielle ou complète agénésie du corps calleux et élargissement de la fontanelle antérieure. Elles sont aussi fonctionnelles; protéinurie, retard développemental, surdité et myopie forte (Figure 4). Toutes ces anomalies sont retrouvées dans plus de 90 % des patients atteint du syndrome. Dans près de 50 % on détecte une hernie diaphragmatique congénitale et un omphalocèle (Pober et al., 2009). La gravité de ces différentes anomalies mettent en lumière l'importance de la mégaline/lrp2 durant le développement; que ce soit celui du cerveau ou des reins.

Le lien entre la mégaline/lrp2 et la myopie forte n'est pas clairement établi.

I-5-Inactivation de la mégaline/lrp2 chez la souris

I-5-1-Inactivation constitutive

Chez la souris l'inactivation de la mégaline/lrp2 conduit à de nombreuses malformations (Willnow et al., 1996b). Parmi elles on peut noter une holoprosencéphalie, fusion anormale des deux hémisphères avec une absence des bulbes olfactifs et aussi du corps calleux (Willnow et al., 1996b). De manière intéressante on peut aussi noter un spectre de malformations oculaires important, allant de l'anophtalmie bilatérale à une microphthalmie monolatérale (Willnow et al., 1996b). La majorité des *mutants* meurt deux à trois heures après la naissance par insuffisance respiratoire et seulement 2% de souris mutantes survivent jusqu'à l'âge adulte (Willnow et al., 1996b).

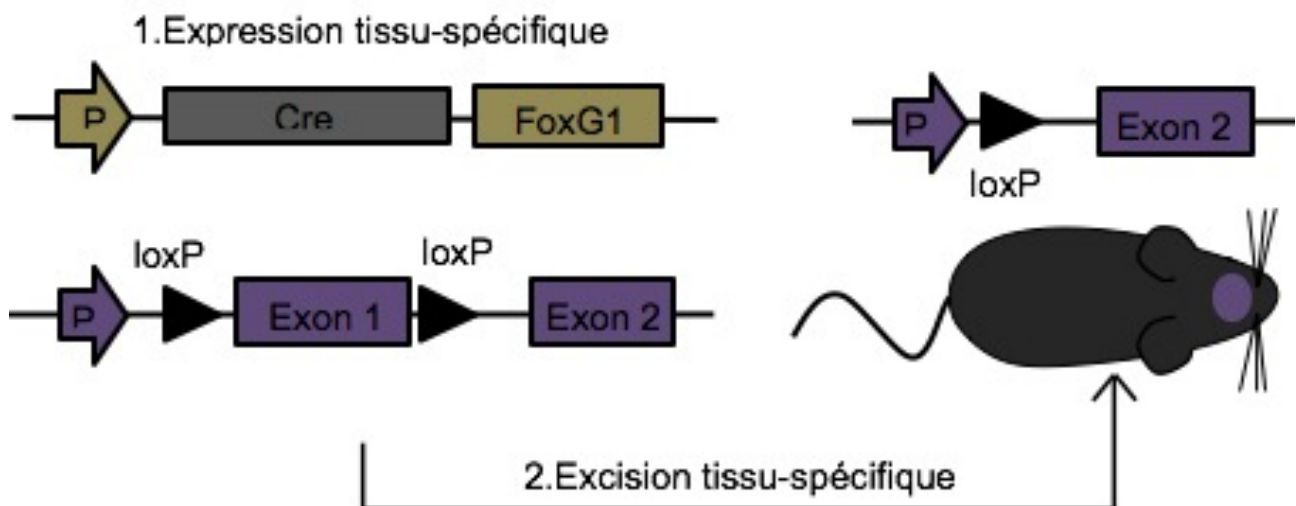


Figure 5 : Le modèle de souris FoxG1-Cre Meg^{L/L}.

Schéma représentant la construction du modèle de souris FoxG1-Cre Meg^{L/L}.

Le croisement de la lignée de souris portant la construction Cre sous l'action du promoteur (P) de FoxG1, avec la lignée de souris portant la construction Meg LoxP/LoxP a pour conséquence l'inactivation de la mégaline dans le télencéphale et toutes les structures qui en dérivent, dès E9.

I-5-2-Inactivation conditionnelle

Pour étudier la fonction de la mégaline/lrp2 des inactivations tissu-spécifiques ont été réalisées. L'inactivation de la mégaline/lrp2 dans le rein *via MORE-Cre* (Amsellem et al., 2010) a permis d'établir un modèle murin de protéinurie indispensable pour l'étude des pathologies rénales comme la fibrose.

Pour affiner l'étude de la fonction de la mégaline/lrp2 dans le développement du prosencéphale et de l'œil nous avons, dans notre laboratoire, invalidé de manière conditionnelle la mégaline/lrp2 dans différents compartiments cellulaires. Les différentes lignées de souris exprimant l'enzyme CRE étaient la lignée *Wnt1-CRE* qui permet une invalidation dans les crêtes neurales céphaliques (Cases et al., 2013), la lignée *hGFAP-CRE* qui permet l'invalidation dans les astrocytes, la lignée *Tbr2-CRE* qui permet l'invalidation dans les cellules ganglionnaires et la lignée *FoxG1-CRE* qui permet l'invalidation dans la rétine neurale, l'épithélium pigmentaire et l'épithélium ciliaire. Les lignées *Wnt1-CRE Meg^{L/L}*, *hGFAP-CRE Meg^{L/L}* et *Tbr2-CRE Meg^{L/L}* ne présentent aucune anomalie morphologique ou fonctionnelle de l'œil.

I-5-3-Les souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*

FoxG1 est un facteur de transcription qui s'exprime précocement dans le neuroépithélium antérieur dès E8.75 (Hébert et al., 2000). En utilisant les séquences régulatrices du gène *FoxG1* en amont du gène codant pour la Cre recombinase, nous avons généré des souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}* présentant une inactivation de la mégaline/lrp2 dès E9 dans le télencéphale et ses structures dérivées comme la rétine et le corps ciliaire (Figure 5).

L'analyse macroscopique a montré que les yeux de ces souris sont anormalement gros.

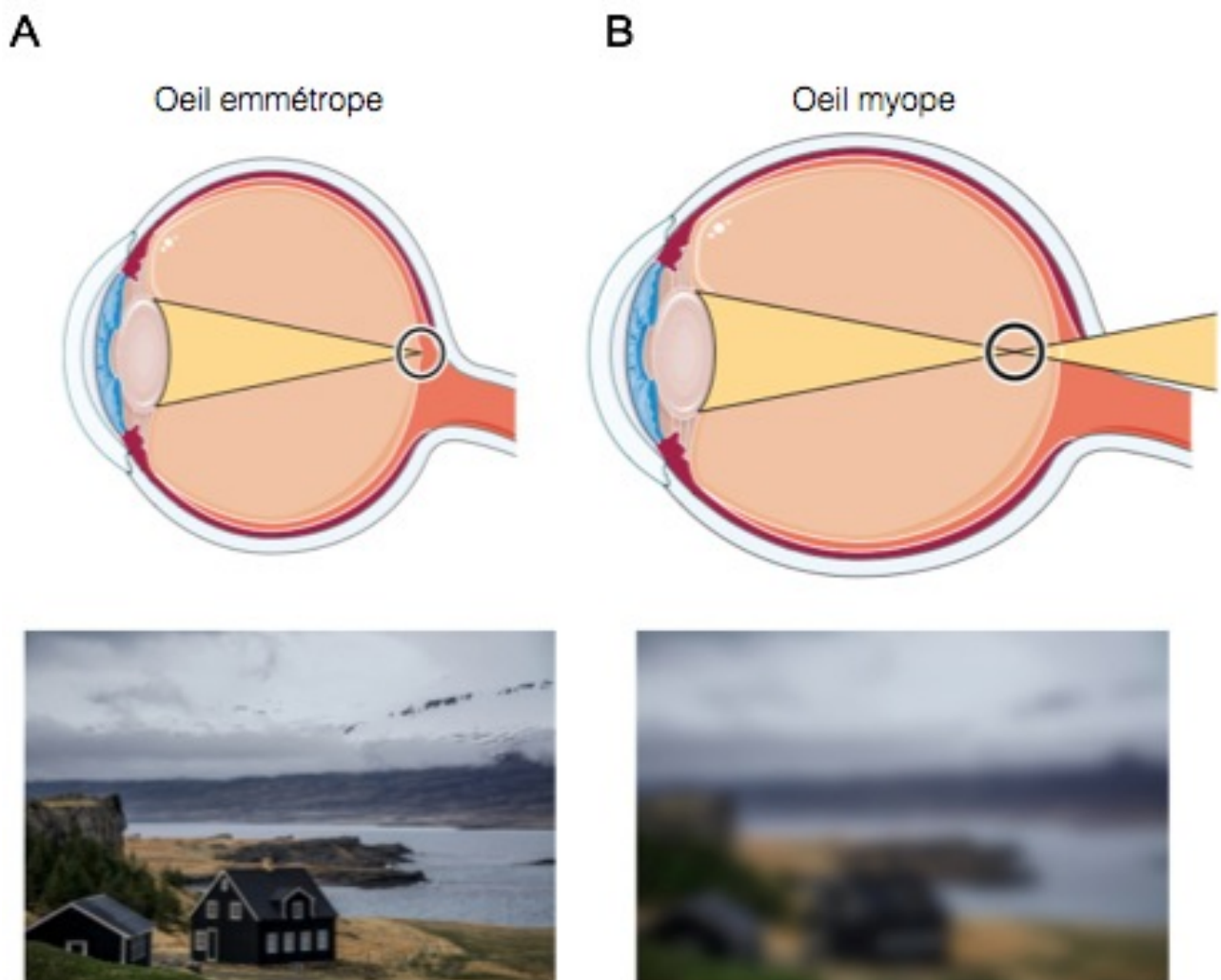


Figure 6 : L'oeil et la vision d'un myope.

Représentation schématique d'un oeil emmétrépe (A) et myope (B) et représentation de la vision d'un objet au loin pour un homme emmétrépe (A) et myope (B). Adapté de *Servier Medical Art*.

II-La myopie forte congénitale

II-1-Généralités sur la myopie et la myopie forte

II-1-1-Définitions

La myopie est généralement due à une augmentation de la longueur axiale (Figure 6). Cette dernière est le résultat de la combinaison de la profondeur de la chambre antérieure, de l'épaisseur du cristallin et la profondeur de la chambre du vitré (Yebra-Pimentel et al., 2004). La myopie peut être faible, modérée ou forte. Les myopies de cette origine sont les plus fréquentes (Young et al., 2007).

La myopie faible correspondant à une erreur de réfraction située entre -0,5 Dioptries (-0,5 D) et -3 Dioptries (-3 D). Puis la myopie modérée qui correspond à une erreur de réfraction située entre -3 D et -6 D. Enfin la myopie forte correspondant à une erreur de réfraction supérieure à -6 D (Young et al., 2007; Xu et al., 2007; Jacobi et al., 2005) et une longueur axiale du globe oculaire chez l'homme supérieure à 26mm (Meng et al., 2010). Cette pathologie est un terrain propice au développement précoce d'autres complications comme le glaucome (Detry-Morel, 2011; Chen et al., 2012) ou la cataracte (Brown & Hill, 1987).

Dans certains cas la myopie forte est pathologique. Elle est dans ce cas progressive et associée à une rétinopathie (dégénérescence rétinienne et staphylome), cette myopie conduit à la cécité. Aucun traitement n'existe à ce jour.

II-1-2-Prévalence de la myopie et de la myopie forte

La prévalence de la myopie et la myopie forte varient selon l'âge et la région où des études ont été réalisées (Figure 7). Toutes ces études montrent que la myopie est le trouble de la vision le plus répandu à travers le monde, affectant près de 20% de la population des pays industrialisés, jusqu'à 50 % pour l'Amérique du Nord (Kempen et al., 2004). Ces études montrent que le travail de près, induit par une scolarisation et des hautes études plus fréquentes dans les pays industrialisés, favoriserait l'apparition de la myopie (Ip & Coll, 2008). De manière intéressante dans les pays asiatiques, la prévalence de la myopie est beaucoup plus élevée. Approximativement 80 % de la population urbaine

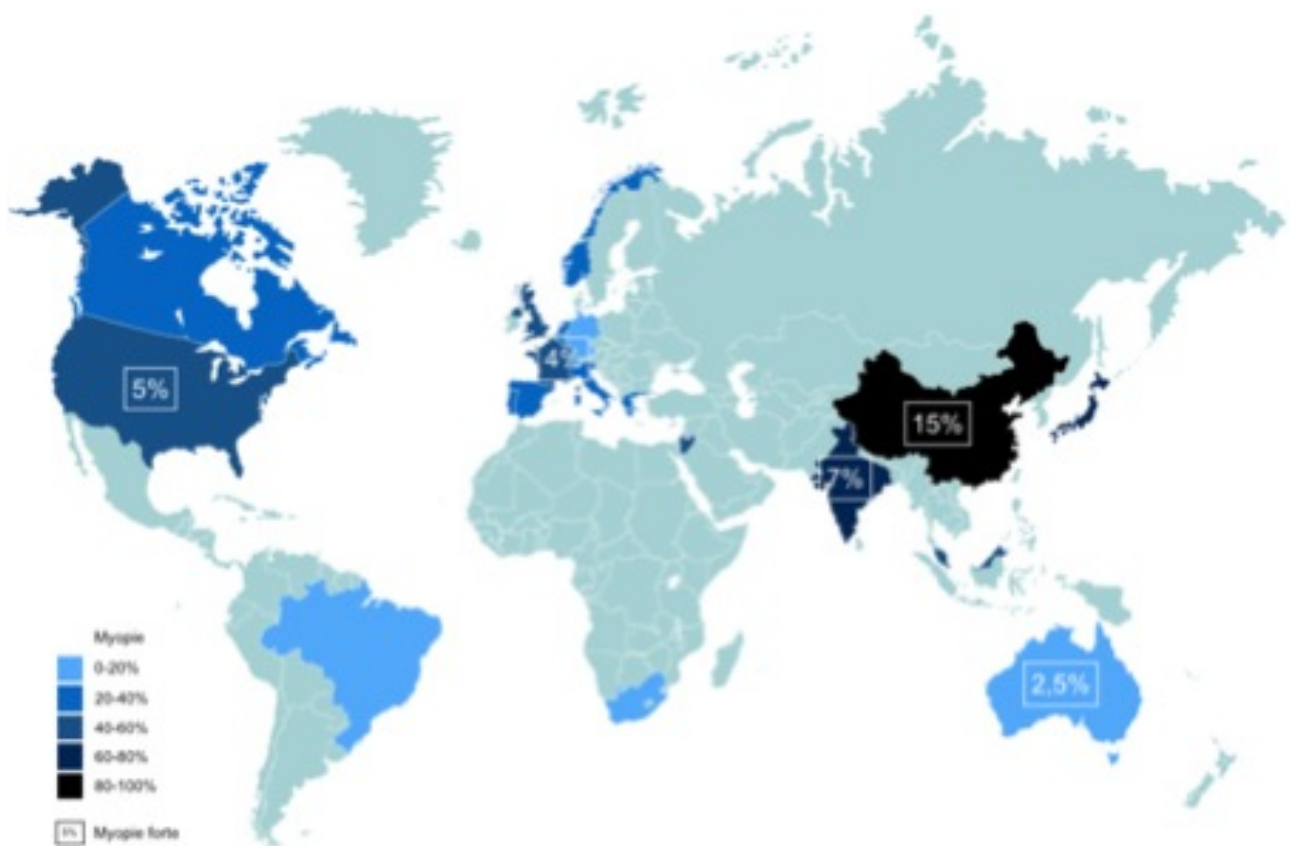


Figure 7 : Prévalence de la myopie et de la myopie forte à travers le monde.

Carte du monde représentant la prévalence de la myopie dans le monde et en encadré celle de la myopie forte. Adaptée de *Servier Medical Art*.

est myope (Goh & Lam, 1994; Woo et al., 2004; Morgan et al., 2012; Lin et al., 2004). Le travail de près serait la cause de ce taux élevée mais c'est surtout l'hyper-connection, le temps passé devant des écrans d'ordinateur, de smartphones et de tablettes, dans cette région qui favoriserait l'apparition de la myopie, en sollicitant beaucoup plus la vision de près (Lee et al., 2013). La prévalence de la myopie a augmenté significativement depuis ces trente dernières années (Vitale et al., 2009; Kempen et al., 2004).

En 2004, la prévalence moyenne de la myopie forte dans les pays industrialisés était estimé à 4,5 % (Kempen et al., 2004). Là aussi, la prévalence dans la population asiatique est plus élevée. Environ 10 à 15 % de myope fort y sont recensés dans la population urbaine (Kempen et al., 2004; Fuch, 1960; Wong et al., 2000) et même 20 % dans certaines populations asiatiques (Morgan et al., 2012; Lin et al., 2004; Morgan et al., 2005) (Figure 7), sans doute dû à la forte proportion de myope et donc à un terrain plus propice au développement d'une forte myopie.

II-1-3-Les mécanismes moléculaires à l'origine de la myopie forte

Les mécanismes moléculaires caractérisant la myopie forte ne sont pas connus. Cependant plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cet allongement. Une hypothèse « mécanique » qui fait appel à des facteurs diffusibles qui agissent sur une sclère affaiblie (Leung et al., 2011; Rada & Wiechmann, 2006). La sclère est ainsi prédisposée, soit de façon acquise (Rada & Wiechmann, 2006), soit de façon héréditaire (Leung et al., 2011), à s'étirer sous l'action de forces mécaniques; comme la pression intraoculaire, les forces mécaniques des muscles oculomoteurs sur la sclère et la musculature intrinsèque au moment de l'accommodation. Un autre mécanisme repose sur le processus qui régule la croissance du globe oculaire vers l'emmétropie, et qui est directement influencé par l'expérience visuelle, ceci a été prouvé par l'induction de la myopie par privation expérimentale (Cf. II-5-Modèles animaux). Il existe un troisième mécanisme moins connu mais déterminé quant à lui par la génétique (Vessey et al., 2005; Bertrand et al., 2006). Même si la pathogenèse de la myopie forte n'est pas établie, il est clair que des facteurs génétiques et environnementaux y contribuent.

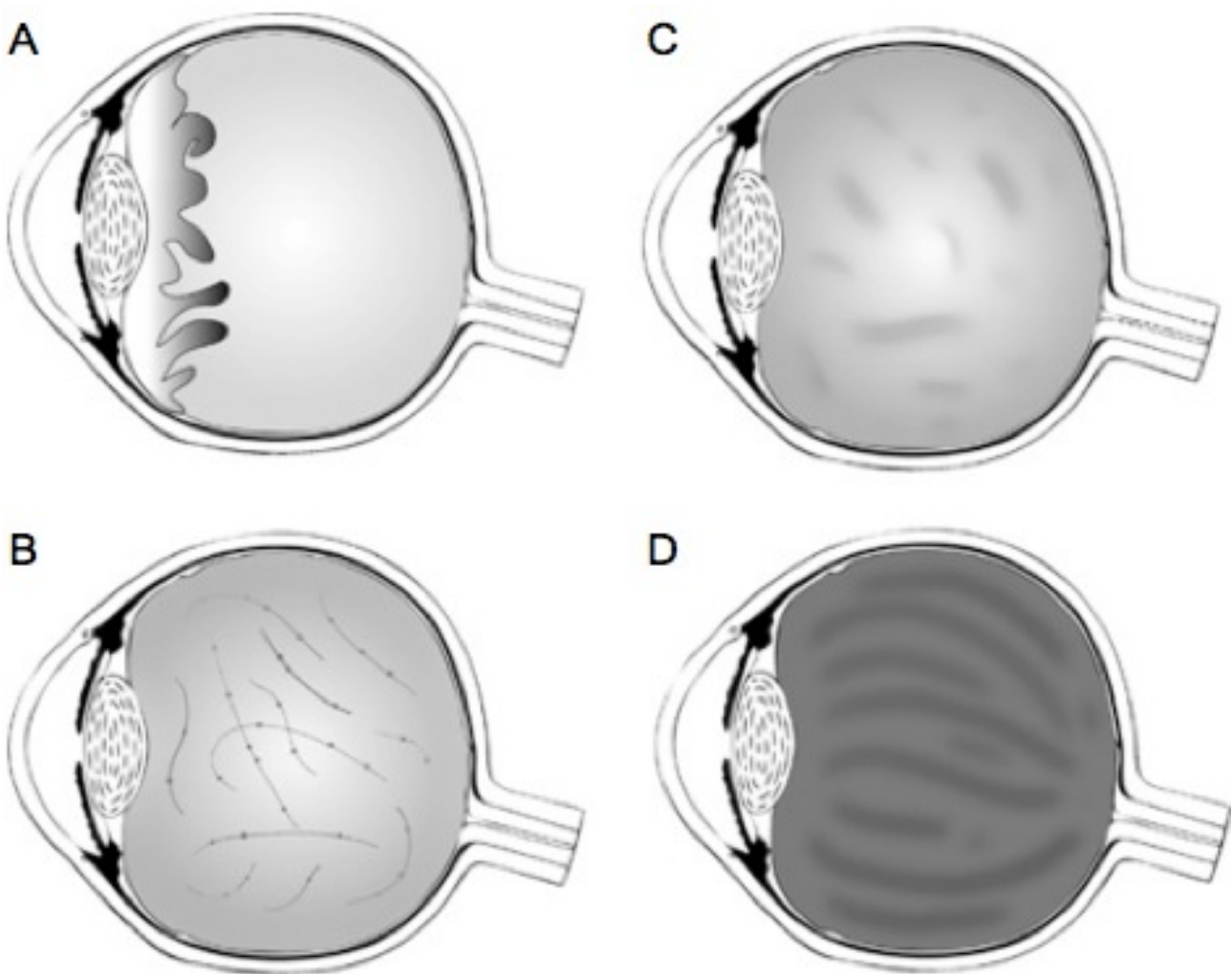


Figure 8 : Collagénopathie et myopie forte; le syndrome de Stickler.

Représentation schématique des différents phénotypes du corps vitré dans le syndrome de Stickler. (A) Anomalie de la membrane du vitré, (B) Anomalie « perlé » du vitré, (C) Hypoplasie congénitale du vitré, (D) Architecture du vitré normale: zone lamellaire compacte. *Snead et al., 2011.*

II-2-Formes syndromique et facteurs génétiques

II-2-1-Formes syndromique de la myopie forte

Dans certains cas, la myopie forte est associée à des syndromes multi-phénotypiques présentant des anomalies oculaires, oro-faciales, musculaires et de l'audition (Snead et al., 2011), tels que la maladie de Marfan (Dietz et al., 2001), le syndrome de Stickler (Snead & Yates, 1999) le syndrome de Marshall (Annunen et al., 1999), la maladie de Weill Marchesani (Tian et al., 2009), la maladie de Knobloch (Bongiovanni et al., 2011) ou encore l'homocystinurie (Cruysberg et al., 1996). La majorité de ces syndromes sont dus à des défauts dans le collagène de la matrice extracellulaire, tel que le syndrome de Stickler de type I et de type II (Snead et al., 1994; Snead et al., 1996) ou dans le cas du syndrome de Marshall (Shanske et al., 1998). Ces deux syndromes sont des formes de collagénopathies, caractérisés par une forte atteinte oculaire comme le développement d'une forte myopie, des décollements rétiniens, une dégénérescence du vitrée et le développement de cataracte (Annunen et al., 1999). Plus particulièrement, le syndrome de Stickler est une anomalie congénitale qui a lieu durant le développement embryonnaire du vitré qui a pour conséquence un remodelage anormal de son architecture (Snead et al., 2011) (Figure 8). Un débat existe autour du fait que le syndrome de Stickler et le syndrome de Marshall soient deux entités distinctes, car des anomalies ectodermiques et un hypertélorisme sont seulement détectés chez les patients atteints du syndrome de Marshall (Shanske et al., 1998). Dans les deux cas plusieurs gènes de collagènes sont impliqués dans le développement des deux syndromes. En effet des mutations sur *COL11A1* est à l'origine du syndrome de Stickler et du syndrome de Marshall. (Khalifa et al., 2012). De plus des mutations sur les gènes *COL2A1* (Vikkula et al., 1995), *COL9A1* (Van Camp et al., 2006) et *COL9A2* (Baker et al., 2011) ont été reportées dans l'apparition du syndrome de Stickler.

On retrouve aussi le développement d'une myopie forte chez les patients atteints du syndrome de Donnai-Barrow (Donnai and Barrow, 1993).

II-2-2-Facteurs génétiques impliqués dans la myopie forte

Le mode de transmission de la myopie est variable: transmission autosomique dominante, transmission liée à l'X ou encore transmission autosomique récessive.

Plusieurs études se sont concentrées sur les facteurs génétiques de la myopie forte en étudiant le génome d'individus atteints de myopie et de myopie forte (Paluru et al., 2003; Gregory-Evans et al., 2004; Nallasamy et al., 2007; Tang et al., 2007)

Les premières études ont été réalisées sur des jumeaux monozygotes et dizygotes. Il a été ainsi montré un taux de concordance pour la myopie de plus de 90% chez les jumeaux monozygotes et de moins de 25% chez les dizygotes (Teikari et al., 1991; Sorsby et al., 1962; Sorsby et al., 1966; Lyhne et al., 2001; Hammond et al., 2001; Lopes et al., 2009). Plus récemment l'héritabilité de l'erreur réfractive a été estimée à 77% (Lopes et al., 2009). Plusieurs études montrent une corrélation entre une myopie parentale et la myopie de leurs enfants, indiquant une cause héréditaire (Goss & Jackson, 1996; Pacella et al., 1999; Yap et al., 1993). Ces enfants présentent une élongation de la chambre du vitre même avant que la myopie se déclare (Yap et al., 1993). Cette même étude montre une prévalence de 7,3% d'enfant myope quand aucun des parents n'est myope tandis que le taux est de 26,2% quand l'un des deux parents est myope, pour atteindre 45% quand les deux parents le sont (Yap et al., 1993). L'étude de Naiglin a déterminé un modèle de transmission héréditaire autosomal dominant (Naiglin et al., 1999). Ces études ont ainsi démontré l'implication de facteurs génétiques dans le développement de la myopie, sans pour autant fournir une preuve biologique. Cette preuve a été apportée par les travaux de génétique moléculaire.

En 2004 il a été montré plusieurs régions chromosomiques impliquées dans le déterminisme de l'erreur réfractive; 3q26 (MYP8), 8p23 (MY10) et 4q12 (MY9) ainsi que la région 11p13 (MY7), contenant le gène *PAX6* (Hammond et al., 2004). Quelques années plus tard c'est la région 5q14 qui a été découverte comme ayant un rôle dans le déterminisme de l'erreur réfractive (Zhu et al., 2008).

Plus particulièrement le premier locus de susceptibilité à la myopie forte est identifié en 1990 sur le chromosome Xq28. En 2008 il est impliqué de nouveau chez une famille chinoise atteinte de myopie forte non syndromique (Guo et al., 2010).

Tableau 1 Analyses de liaison familiale et loci de susceptibilité à la myopie forte familiale.

Locus	Chromosome	Références	Population étudiée
MYP1	Xq28	Guo et al.	Chine
MYP2	18p11.31	Young et al.	États-Unis (EU)
MYP3	12q21-23	Young et al.	Italie/Allemagne
MYP4	7q36	Naiglin et al.	France
MYP5	17q21-q22	Paluru et al.	Angleterre/Canada
MYP11	4q22-q27	Zhang et al.	Chine
MYP12	2q37.1	Paluru et al.	Europe du Nord
MYP13	Xq23-q27.2	Zhang et al.	Chine — ethnies Han
MYP15	10q21.1	Nallasamy et al.	Comm. huttérite (EU)
—	15q12-13	Yu et al.	Chine
MYP16	5p15.33-p15.2	Lam et al.	Chine
MYP17	7p15	Paget et al.	France
MYP18	14q22.1-q24.2	Yang et al.	Chine
—	9q34	Li et al.	Mixte
—	5p13.3-p15.3	Ma et al.	Chine
—	7p22, 7p12, 12p12	Rydzanicz et al.	Pologne
—	3q28, LEPREL1	Mordechai et al.	Bédouin — Israël

Comm. Huttérite : Communauté huttérite.

Tableau 3 : Loci de susceptibilité à la myopie forte.

Tableau rapportant une liste non exhaustive de loci de susceptibilité à la myopie forte. Cassagne et al., 2014

Depuis une quinzaine d'autres loci de susceptibilité à la myopie forte non syndromique ont été décrits (Cassagne et al., 2014) (Tableau 3). Toutes ces études ont amené à la localisation d'un seul gène impliqué dans le développement de la myopie forte; *LEPREL1*. Ce gène situé sur le chromosome 3q28, code pour l'enzyme prolyl 3-hydroxylase 2, qui assure l'hydroxylation du collagène (Mordechai et al., 2011; Guo et al., 2013).

A plus grande échelle les études cas-témoins ont permis de mettre en évidence une quarantaine de gène avec une association positive à la myopie ou plus largement à une erreur de réfraction. En 2010, le gène *RASGRF1* est mis en évidence (Hysi et al., 2010), il code pour la protéine Ras, régulée par l'acide rétinoïque et les récepteurs muscariniques. Ces derniers sont connus pour freiner partiellement l'évolution de la myopie. Au même moment les gènes *GJD2* et *ACTC1* sont aussi mis en évidence (Solouki et al., 2010; Verhoeven et al., 2012). Le premier code pour la connexine 36 qui joue un rôle dans la transmission du signal visuel dans la rétine en permettant le transport de petites molécules au niveau des cellules de la rétine. Le deuxième code quant à lui pour une protéine de la famille des actines et interviendrait dans le remodelage de la sclère. De la même manière le gène *CTNND2*, codant pour une delta-caténine à été mis en évidence (Li et al., 2011). Chez la souris cette protéine, joue grâce à un site de liaison avec *PAX6*; un rôle crucial dans la morphogenèse et l'architecture de la rétine.

Plus récemment, en 2013, L'étude réalisée par Hammond a permis de mettre en évidence sur une cohorte de 45,758 individus, 28 nouveaux locis impliqués dans des erreurs de réfractions. Ces nouveaux locis incluent des gènes avec des fonctions dans la neurotransmission de la rétine (*GRIA4*, *GJD2*, *CHRM1*), la formation des canaux ioniques (*KCNQ5*, *RBFOX1* et *KCNMA1*), le métabolisme de l'acide rétinoïque (*RDH5*), la régulation de l'apoptose (*PSARL* et *BLID*), le remodelage de la matrice extracellulaire sclérale; (*COL1A1*, *COL2A1*, *LUM*, *MYOC*, des métalloprotéases; *MMPs* et d'autres protéines; *LAMA2*, *BMP2* et *BMP3*), dans le développement de l'oeil (*SIX6*, *PRSS56*, *PAX6*, *SOX2OT*) (Verhoeven et al., 2013). Ces résultats ont été confirmés sur une autre cohorte de 45,000 individus ou vingt locis ont été mis en évidence comme ayant un rôle dans le développement de la myopie (Kiefer et al., 2013). Enfin, quelques expériences chez le poulet ont associé la myopie et les protéines de la matrice extracellulaire produites (collagène2A1, 11A1) par les astrocytes rétinien et le corps ciliaire (Ahmad et al., 1996).

En plus des facteurs génétiques il existe des facteurs environnementaux qui peuvent influencer l'apparition de la myopie.

II-3-Facteurs environnementaux

La prévalence de la myopie dans certaines populations a fortement augmenté, d'une génération à l'autre, dans des régions de plus en plus industrialisées ou avec l'augmentation du niveau d'étude (Burton, 1989; Lin et al., 1988; Young, 1963; Young, 1967; Rosner & Belkin, 1987), favorisant les activités de près (Wallman, 1994). Dès 2008, une étude a montré que les enfants qui pratiquent peu d'activités extérieures, de plein air sont en moyenne plus myopes que ceux qui pratiquent une activité de plein air de manière régulière et prolongée (Rose et al., 2008). Les enfants qui en plus d'une faible activité de plein air pratiquent régulièrement des activités sollicitant la vision de près (lecture, jeux vidéos) (Rose et al., 2008). Il semblerait que ce soit le temps passé dehors qui soit un élément protecteur contre la myopie, plutôt que la pratique du sport en elle-même (Guggenheim et al., 2012). De plus, l'influence d'une réduction de l'ambiance lumineuse sur la progression de la myopie a été récemment mise en évidence (Cohen et al., 2011). En 2012, Sherwin confirme un effet protecteur sur l'aggravation de la myopie du temps passé à l'extérieur (Sherwin et al., 2012).

Le travail de près, quantifié par le temps passé et la distance de lecture avait une influence indiscutable sur l'existence d'une myopie chez des enfants âgés de 12 ans. Les enfants qui lisaient plus de 30 minutes par jour de manière continue avaient plus de risque d'être myopes que ceux qui lisaient moins de 30 minutes par jour. Ceux qui lisaient à moins de 30 cm avaient une probabilité 2 fois et demi plus importante d'être myopes, et plus fort, que ceux qui lisaient à une distance plus grande (Ip et al., 2002). Ce facteur environnemental prend en compte aussi le temps que nous passons de plus en plus devant notre écran d'ordinateur, ou la télévision (Lee et al., 2013).

Le haut niveau d'étude est associé au développement d'une myopie (Wang et al., 1994); le risque est 4 fois plus élevé de développer une myopie chez les universitaires par rapport aux personnes ayant un niveau d'études primaire (Verhoeven et al., 2013; Morgan & Rose, 2005). De manière intéressante, le fait de pratiquer des cours du soir serait aussi un facteur de risque pour le développement d'une myopie (Morgan & Rose, 2013). Ces cours exigeraient un travail de près associés à un haut niveau d'étude et un défaut d'activités extérieures; trois principaux facteurs de risques (Jones-Jordan et al., 2011; Rose et al., 2008).

D'autres facteurs de risques existent tels que la vie en milieu urbain (Ip et al., 2008) et un niveau socio-économique plus élevée (Wang et al., 1994).

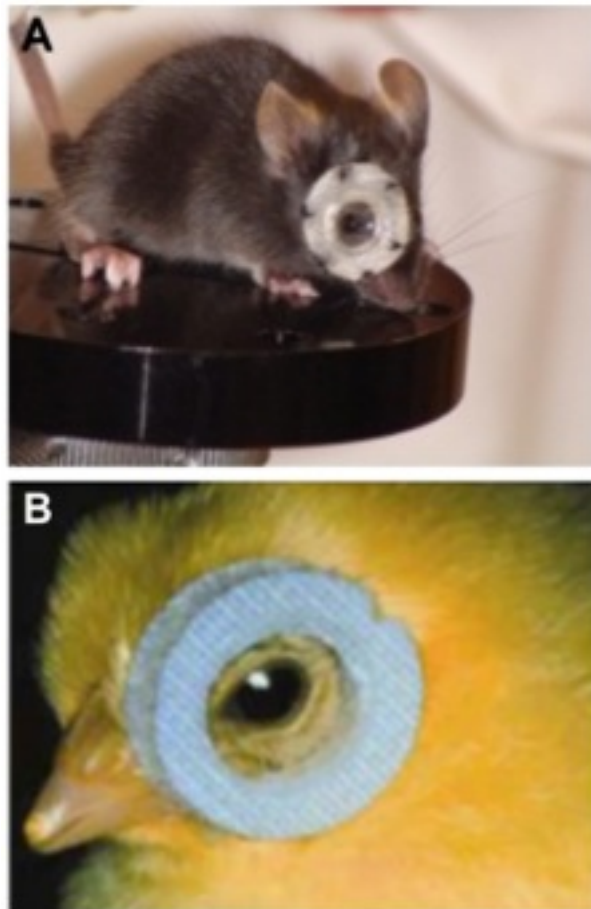


Figure 9 : Les modèles animaux par défocalisation visuelle.

Photographie de modèles animaux de myopie obtenus par défocalisation visuelle, chez la souris (A) et le poulet (B). (A) *Tkatchenko et al., 2010* (B) *Wallman & Winawer*.

II-4-Modèles animaux

Le mécanisme de la myopie n'est pas clair. Plusieurs modèles animaux ont été développés, certains mécanistiques, d'autres génétiques. Les espèces utilisées sont le primate (le ouistiti et le macaque) (Troilo et al., 2006; Raviola & Wiesel, 1985; Smith et al., 1987), la musaraigne (Siegwart et al., 1998; Norton et al., 2006), des petits rongeurs (la souris et le cochon d'Inde) (Tejedor & de la Villa, 2003; Schaeffel et al., 2004, Pardue et al., 2013; Xiao et al., 2014). Dans la plupart des cas les études sur la myopie sont réalisées sur le poulet (Wallman & Adams, 1987; Pickett-Seltner et al., 1988; Rohrer & Stell, 1997; Lawrence & Azar, 2002).

Dans ces études Le développement de la myopie a été obtenu par une défocalisation des deux yeux ou une privation complète de lumière d'un œil (Figure 9 et 10). Tous ces modèles avaient été développés sur des animaux jeunes, avant la fin du développement de l'œil. Ils sont très utiles mais ils ne représentent peut être pas bien ce qui se passe lors de la mise en place de la myopie chez l'homme.

II-4-1-Modèles mécanistiques

i-Modèles par défocalisation visuelle

Ces modèles sont obtenus par la mise en place d'une lentille directement sur l'œil de l'animal (Figure 9). Cette lentille négative provoque une myopie artificielle, par une augmentation de la longueur axiale du globe oculaire (Schaeffel & Howland, 1988). Dès que l'œil arrive à maintenir une vision nette, l'élongation du globe oculaire cesse. De manière intéressante, si la lentille est retirée assez tôt, avant que le développement de l'œil adulte soit achevé, l'œil peut restaurer une emmétropie, et retrouver une longueur axiale normale (Wallman & Adams, 1987) (Figure 9).

ii-Modèles par privation visuelle

Une privation monoculaire complète de la lumière peut être réalisée par suture de la paupière. Mais une modulation de la lumière perçue par les yeux peut être aussi effectuée, avec l'utilisation d'une couverture opaque (Figure 10 D) ou un diffuseur translucide (Figure 10 C). Les résultats obtenus dans ces études montrent que la longueur axiale du globe oculaire ne cesse de croître, ne ralentissant que lorsque l'œil est réexposé aux rayons lumineux (Siegwart & Norton, 1998; Schaeffel et al., 2004; Shen et al.,

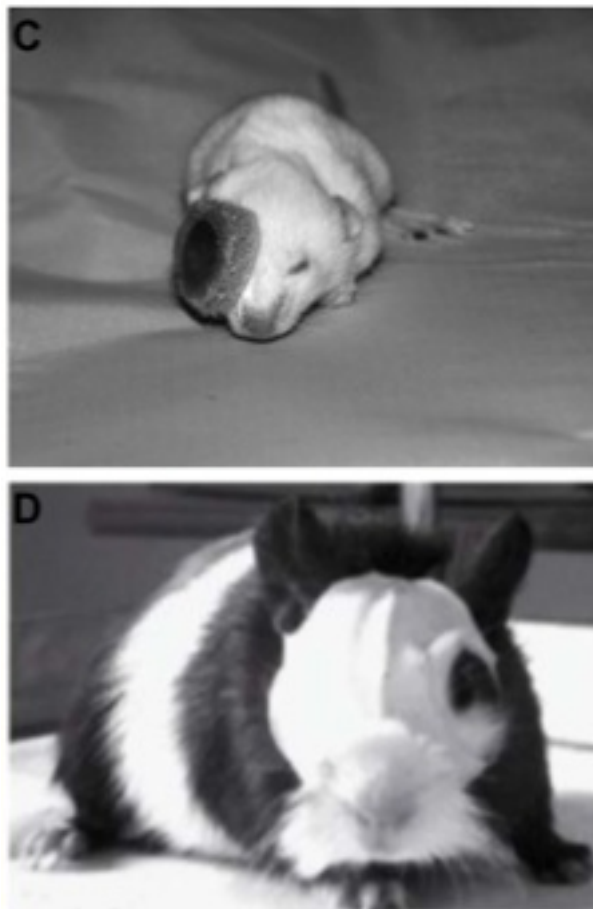


Figure 10 : Les modèles animaux par défocalisation visuelle.

Photographie de modèles animaux de myopie obtenus par privation visuelle, chez la souris (C) et le cochon d'Inde (D). Zhao et al., 2011.

2005; Troilo & Judge, 1993; Wallman et al., 1978; Wiesel & Raviola, 1977). Une fois cette couverture retirée, l'œil retourne vers une emmétropie et restaure une longueur axiale optimale. Dans ce modèle aussi, si la lentille est retirée avant que le développement de l'œil adulte soit achevé, l'œil peut restaurer une emmétropie (Norton & Rada, 1995; Wallman & Winawer, 2004). Dans le cas contraire, la myopie persiste.

Les études sur ces modèles animaux, dont l'élongation du globe oculaire a été induite par des facteurs environnementaux, reproduisent le même phénotype que la myopie humaine. Cependant ces modèles présentent des myopies faibles à modérées. Dans aucun de ces modèles une myopie forte va être induite. De plus ces animaux sont des modèles mécanistiques et la myopie induite n'est que transitoire.

En général, les études réalisées sur le poulet ont montré qu'en une semaine de défocalisation une myopie forte peut être induite (Wallman & Adams, 1987; Pickett-Seltner et al., 1988; García de la Cera et al., 2006). Mais il est important de noter que chez le poulet, la sclère est constituée d'une couche interne cartilagineuse et d'une couche externe fibreuse. L'élongation du globe oculaire induit une augmentation de l'accumulation des protéines totales et ceci par l'augmentation de la synthèse, l'accumulation et la croissance de protéoglycanes, au niveau de la couche interne cartilagineuse (Rada et al., 1991; Rada et al., 2002; Gentle et al., 2001). Chez les mammifères, la sclère est quant à elle constituée d'une seule couche fibreuse. L'expansion de la longueur axiale du globe oculaire n'est pas due à une nette élongation, mais plutôt à un remodelage de la sclère via une diminution de la synthèse de protéoglycanes et à une diminution de l'épaisseur de la sclère (Gao et al., 2011). Dans ce cas, l'utilisation des primates semblent être plus adéquates pour la compréhension du mécanisme de la myopie humaine. En effet, d'un point de vue anatomique et physiologique ils se rapprochent nettement plus de l'homme (Rada et al., 2000; Troilo et al., 2000). Mais la disponibilité très limitée, le coût élevé et la question éthique empêchent son utilisation plus courante en tant que modèle. De plus, les études réalisées sur ce modèle ont montré généralement une période plus longue pour l'induction de la myopie que celle nécessaire pour les autres modèles utilisés (Troilo et al., 2000). Dès lors l'utilisation de rongeurs comme modèle de myopie forte se révèle judicieux. En effet les animaux comme le cochon d'Inde ou la souris s'avère être des modèles au vu de leur faible coût, et leur élevage aisé. De plus, l'anatomie et la

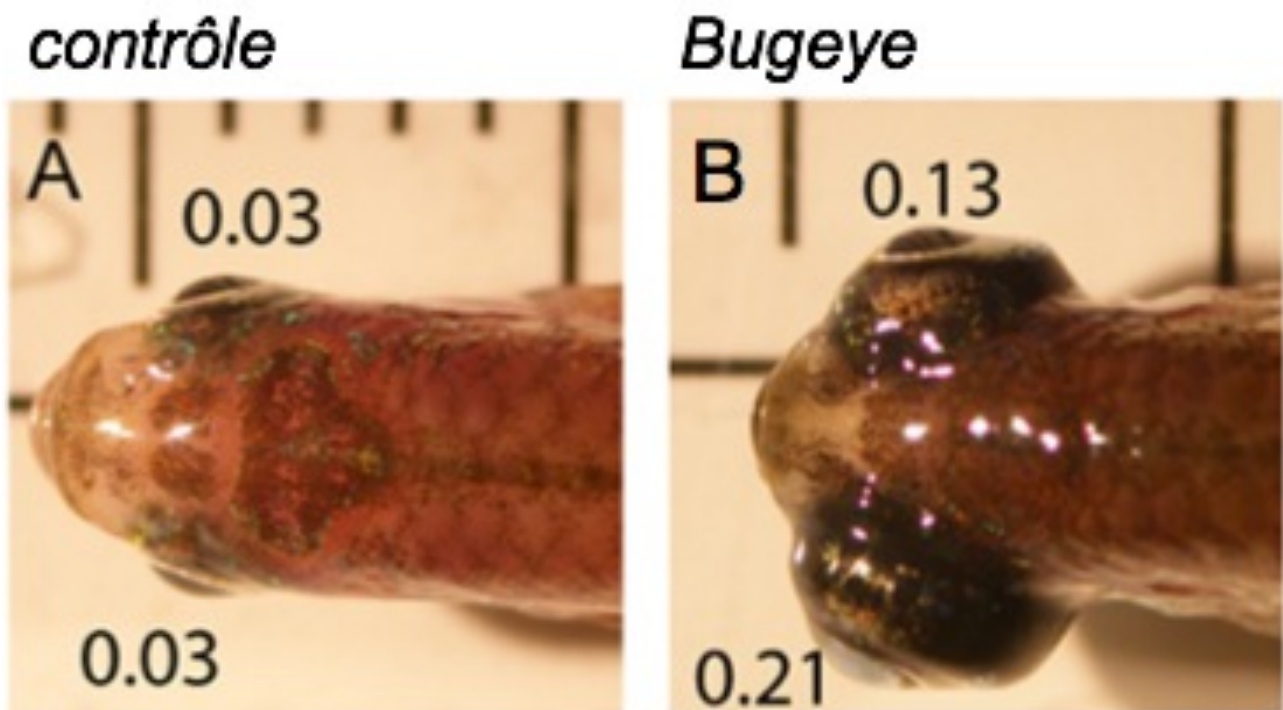


Figure 11 : Le poisson zèbre *Bugeye*.

Photographie d'un poisson zèbre contrôle (A) et mutant *Bugeye* (B). Pour chaque est indiqué le ratio entre la taille de l'oeil et celui de l'animal. *Veth et al., 2011.*

physiologie oculaire sont similaires à ceux de l'homme. Du fait de leur sensibilité à la privation et à la défocalisation, la souris et le cochon d'Inde ont été utilisés dans des études récentes sur la myopie (respectivement Dong et al., 2011; Howlett & McFadden, 2007 et Faulkner et al., 2007). Dans l'ensemble, ces études sur les rongeurs, ont montré des altérations, surtout au niveau de la rétine, qui ne sont jamais associées à la myopie humaine. Ces mêmes études montrent une apparition et un degré de myopie individu-dépendant (Morgan et al., 2013). Des facteurs externes comme la lumière ambiante, ont été montrés comme retardant le développement de la myopie dans les modèles (Smith EL 3rd et al., 2012; Ashby & Schaeffel, 2010; Bartmann et al., 1994). Mais tous ces modèles sont des modèles mécanistiques et donc transitoires. De plus, il n'est pas certain qu'ils reproduisent le développement de la myopie chez l'homme.

II-4-2-Modèle génétique

Il existe un modèle génétique chez le poisson-zèbre; *le bugeye*. Ce poisson présente une mutation dans la région C-terminale de la mégaline/Irp2, à l'origine d'une pathologie oculaire similaire à la myopie forte (Veth et al., 2011). Ce poisson présente une augmentation de la longueur axiale de l'œil, une augmentation de la pression intraoculaire et une mortalité élevée des cellules ganglionnaires (Veth et al., 2011) (Figure 11). C'est un modèle intéressant mais les propriétés optiques et anatomiques de l'œil sont éloignées de celles des yeux des vertébrés supérieurs et des mammifères. L'œil du poisson est sphérique et la structure de l'angle iridocornéen diffère de celle des hommes (Veth et al., 2011).

Plus récemment, une lignée de souris *More-Cre* a montré un allongement axial du globe oculaire et des anomalies dans la structure de l'épithélium pigmentaire rétinien et celle du corps ciliaire (Storm et al., 2014). La description basique du phénotype et la très forte mortalité chez ces souris empêchent tout approfondissement du mécanisme.

Dans notre laboratoire, nous avons eu recours à l'utilisation de la lignée de souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*, qui présentent une inactivation de la mégaline/Irp2 dans le neuroépithélium (Cf. I-5-3-Les souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*).

1^{ERE} PARTIE : RESULTATS

I-L'inactivation de la mégaline/lrp2 dans le cerveau antérieur reproduit fidèlement la myopie forte congénitale.

Résumé: La myopie est un trouble oculaire généralement due à une augmentation de la longueur axiale du globe oculaire. Dans sa forme la plus extrême, la myopie forte, des atteintes dégénératives progressives comme l'atrophie chorioretinienne et un staphylome postérieur sont observées (Lai et al., 2008; Mitry et al., 2012). Ces complications mènent à l'apparition de la cécité. Jusqu'à aujourd'hui il est difficile de contrôler ou de prévenir la progression de la myopie forte, et de traiter les complications qui en découlent. L'absence de modèle animal qui mimerait cette pathologie ralentit les études sur ce sujet (Pardue et al., 2013).

Des mutations dans le gène codant pour la mégaline/Lrp2, associées aux syndromes Donnai-Barrow (Kantarci et al., 2007) et Stickler (Schrauwen et al., 2014) caractérisés par la présence d'une myopie forte, suggèrent fortement que la mégaline/lrp2 serait impliquée dans la régulation de la croissance oculaire.

Pour clarifier ce lien nous avons généré les souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*. A l'état homozygote les souris mutantes montrent une élongation significative de l'axe oculaire spécifiquement due à une augmentation de la profondeur de la chambre du vitré. De plus, des modifications dégénératives de la rétine et de la sclère sont mises en évidence ainsi que des modifications dans la composition et la consistance du vitré (Patel et al., 2007; Holekamp, 2010).

Ces résultats montrent que la mégaline/lrp2 est requise pour la croissance oculaire postnatale et que la lignée de souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}* reproduit probablement le phénotype de myopie forte observée chez les patients Donnai-Barrow. Puisque les facteurs environnementaux influencent la progression de cette pathologie et que le phénotype des souris mutantes s'aggrave progressivement durant la première année de vie, nous proposons que ces souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}* soient un outil très utile pour distinguer la contribution génétique et celle des facteurs environnementaux dans l'évolution du phénotype de la myopie forte.

Lrp2 inactivation in the forebrain faithfully models congenital high myopia

Authors

Olivier Cases^{1,2,3}, Antoine Joseph^{1,2,3}, Antoine Obry⁴, Mathieu Santin⁵, Sirine Ben-Yacoub^{1,2,3}, Michel Pâques^{1,2,3,6}, Sabine Amsellem^{1,2,3}, Ana Bribian⁷, Manuel Simonutti^{1,2,3}, Sébastien Augustin^{1,2,3}, José Alain Sahel^{1,2,3,6}, Thomas Willnow⁸, Fernando de Castro⁷, Stéphane Lehericy⁵, Pascal Cosette⁴ and Renata Kozyraki^{1,2,3}

Affiliations

¹ INSERM, U968, Paris, F-75012, France;

² UPMC Univ Paris 06, UMR_S968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France;

³ CNRS, UMR_7210, Paris, F-75012, France;

⁴ Université de Rouen, CNRS, UMR_6270, Plateforme Pissaro, Mont-Saint-Aignan, F-76821, France;

⁵ Centre de NeuroImagerie de Recherche, Paris, F-75013, France;

⁶ Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, F-75012, France;

⁷ Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain

⁸ Molecular cardiovascular research, Max Delbrück Centre, Berlin, Germany

Corresponding author: Renata Kozyraki, renata.kozyraki@inserm.fr

Authorship note: Olivier Cases and Antoine Joseph contributed equally to the work

Abstract

Myopia is a common ocular disorder generally due to increased axial length of the eye-globe. Its extreme form high myopia (HM) is a multifactorial disease leading to retinal and scleral damage, visual impairment or loss and is thus an important health issue. Mutations in the endocytic receptor *LRP2* gene result in Donnai-Barrow (DBS) and Stickler syndromes, both characterized by HM. To clearly establish the link between *Lrp2* and congenital HM we inactivated *Lrp2* in the mouse forebrain. High resolution *in vivo* MRI and fundus imaging showed that the adult *Lrp2*-deficient eyes were 40% longer than the control ones and that they progressively developed chorioretinal atrophy and posterior scleral staphyloma. Increased eye lengthening was observed by post-natal day 7 (P7) and was accompanied by a rapid decrease of the retinal ganglion, bipolar and photoreceptor cells. It was followed by scleral thinning, reduced number of scleral collagen fibers and dissociation of the collagen fiber bundles. Biochemical and proteomic vitreous analysis revealed that the mutant vitreous was highly liquid, a modification commonly observed in HM, and that its soluble protein composition was well correlated with the progression of the disease. We conclude that *Lrp2* is crucial for normal eye growth. Its disruption in the forebrain faithfully summarizes the severe myopic phenotype of DBS and Stickler patients providing thus a unique tool to further study the human pathology.

Introduction

Myopia usually results from an eye that has become too long, generally through elongation of the vitreous chamber. It is a major health issue because of its increasing prevalence worldwide and the vision-threatening pathologies associated with high myopia (HM). HM affects 1%-3% of the population and is defined as refractive error greater than -6 diopters with axial eye length more than 26 mm. HM has a clearly defined genetic component and both isolated and syndromic forms have been described (1, 2). In addition to the genetic mutations that influence the size of the eye the clinical state of the highly myopic globe also depends on age and exposition to environmental factors. Indeed highly myopic eyes are especially susceptible to progressively develop degenerative changes including myopic chorioretinal atrophy and posterior staphyloma, complications that can cause visual loss (3–6). It is currently difficult to control the progression of HM, to prevent or treat its associated complications and further comprehension of its pathogenesis is hampered by the lack of a genetic animal model that mimics the human pathology (7).

Mutations in the *LRP2* gene (2q23.3-3.1) encoding the multiligand endocytic receptor LRP2/Megalin have been associated with two distinct rare genetic syndromes, the Donnai-Barrow or facio-acoustico-renal syndrome (DBS/FOAR) and the Stickler syndrome characterized by facial, skeletal and auditory findings (8, 9). Ocular defects, including HM, are common in these syndromes suggesting that *LRP2* might be involved in the regulation of eye growth. Recently nonsense mutations in the zebrafish *Lrp2* were shown to result in uni- or bi-laterally enlarged eyes (*bugeye*) and increased intra-ocular pressure (10). The authors proposed *bugeye* as a tool to study both glaucoma and HM but the variability and relatively low penetrance of the *bugeye* ocular phenotype may be restrictive to model these human

diseases. More recently, the *More-Cre* mediated inactivation of the *Lrp2* gene in the mouse epiblast (11, 12) was reported to result in adult-onset myopia (13). This was very surprising because the same inactivation is known to result in microphthalmia and peri-natal lethality with only 5% of the mutants surviving in adult life (11, 12). Although mosaic inactivation of *Lrp2* via the *More-Cre* (14) may provide some explanation for the latter results the reported inconsistency of the *More-Lrp2* ocular phenotype and its increased peri-natal lethality are severe limitations for its use as a mouse model of myopia.

We here use a floxed *Lrp2* allele (11, 12) and the *Foxg1-Cre* transgene, expressed in the developing forebrain and retina from embryonic day 9.0 (E9.0) onward (15), to generate *FoxG1.Cre Lrp2^{L/L}* mice. Homozygous *FoxG1.Cre Lrp2^{L/L}* (*Lrp2^{FoxG1.cre-KO}*) mutants display early, post-natal onset bilateral eye enlargement. The adult mutant eyes are 40% longer than the control ones and the excessive axial elongation is due to increased vitreous chamber depth. Whereas the intraocular pressure is apparently normal in the mutants, a feature previously described in highly myopic DBS patients (16) degenerative changes are evidenced in the retina and sclera, including formation of posterior staphyloma. The vitreous is highly liquid, another typical feature of HM (17) and the liquid vitreous proteome is modified compared to the controls. We conclude that *Lrp2* expressed in the anterior neuroepithelium is required for normal post-natal eye growth and that the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mice faithfully summarize the HM phenotype constituting thus the first genetic mouse model of congenital HM. Because age-associated exposition to environmental factors influences the progression of HM and the ocular phenotype of the mutants progressively aggravates over the first year of life we propose that the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mouse will provide a valuable tool to distinguish between the contribution of genetic and environmental factors in the evolution of the HM phenotype.

Methods

Animals

Animal procedures were conducted in strict compliance with approved institutional protocols and in accordance with the provisions for animal care and use described in the European Communities council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). *Foxg1*.Cre (129.Cg-*Foxg1*^{tm1(cre)Skw}/J)(15), *Wnt1*-Cre (Tg(Wnt1-cre)11Rth/MleJ)(18) mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). *hGFAP*-Cre (19) and *Lrp2*^{Lox/Lox} (20) mice have been described elsewhere. Gestation (E0.0) was considered to have begun at midnight before the morning when a copulation plug was found.

Immunohistochemistry-Immunofluorescence

Whole embryos were immersed in a solution of 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hour at 4°C on a rocking platform. Embryos were frozen and cut into sections 10 µm thick. Pups and adults were anesthetized and perfused transcardially with 4% PFA in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4. After perfusion, eyes were removed from the skull and postfixed overnight in fresh fixative. Serial frozen sections were processed for immunocytochemistry using sheep anti-megalin (1/2000), mouse anti-Brn3a (1/125; MAB1585, Millipore, CA 92590), anti-Tuj1 (1/250; MAB1637, Millipore) and anti-HSP70 (1/200; SMC-114C/D, StressMarq, Canada), and rabbit anti-Aquaporin 4 (1/250; AB3594, Millipore), anti-cleaved Caspase-3 (1/200 ; 557035, BD Pharmingen, CA 95131), anti-GFAP (1/500; Z0334, Dako, Denmark DK-2600), anti-phospho Histone H3 (1/200 ; MABE13, Millipore), anti-OTX2 (1/250; AB9566, Millipore), anti-Pax6 (1/100; PRB-278P, Covance, CA 92121), and anti-PKCα (1/1000; SC-208, Santa Cruz, CA 95060) and anti-200 kDa neurofilament (1/1,000; ab88043; Abcam, UK). Lectin PNA conjugates (1/50; L-21409, Molecular Probes, OR 97402) were also used. Alexa 488- or 594-conjugated antibodies (1:200, Invitrogen) were used for secondary

detection. Nuclear staining was achieved in Hoechst 33342. Fluorescent images were obtained using an Olympus confocal microscope (FV-1200-IX83).

Morphometric analysis

For all quantification, slides were coded and counts were performed with the examiner blind to the time point, genotype, and treatment. Coronal sections of wild-type, and *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mice were Nissl stained and analyzed using a 40× objective and a millimetric eyepiece. For each specimen, the retinal thickness and the number of cells were estimated on the two eyes in ten sections spaced by 40 µm. The number of Nissl profiles was counted in an area of 40,000 µm² in the GCL, INL, and ONL. The count was performed in a region excluding the ciliary margin and the optic nerve head. Statistical comparisons between wild-type, and *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} were done using the unpaired Student's *t* test.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling staining.

Pups and adults were anesthetized, and their eyes were immediately removed and frozen in isopentane. To visualize nuclei with DNA cleavage, serial sections (20 µm) of the eye were cut on a cryostat, and residues of fluorescein-labeled nucleotides were catalytically added to DNA fragments by terminal deoxy-nucleotidyl-transferase (TdT). Briefly, sections were fixed in fresh 4% PFA/PBS at room temperature for 15 min, washed in PBS three times for 5 min, equilibrated at room temperature for 10 min, and incubated with nucleotide mix and TdT (ApoAlert DNA fragmentation kit; Clontech, Mountain View, CA) at 37°C for 1 h. Tailing reaction was stopped by incubating sections in 2× SSC at room temperature for 15 min. The number of apoptotic profiles was counted in an area of 40,000 µm² in the retina. The count was performed in a region excluding the ciliary margin and the optic nerve head. Statistical

comparisons between wild-type, and *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} were done using the unpaired Student's *t* test.

High resolution MRI

Mice were anesthetized with a mixture of isoflurane (5% for induction, 1-2% for maintenance) air (1 L/min) and dioxygen (0.2 L/min). 100 µl of MRI contrast agent (Gd-DOTA, Dotarem, Guerbet, France) were injected intra-peritoneally on each mouse prior to MRI scans. In vivo MRI scans were performed on an 11.7T spectrometer (117/16 USR Biospec, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) equipped with a BGA9-S gradient insert (740 mT/m, rise time 100µs) and interfaced with a console running Paravision 5.1. An MRI Cryoprobe dedicated to mouse imaging was used both for emission and reception of the NMR signal. A fast 2D-gradient echo sequence (FLASH) was used to position slices bisecting the optic nerve of the mouse eye (TR/TE=567.1/3.7 ms, Nex=1, Mtx=384*256, field-of-view=2.30*1.54 cm yielding an in-plane resolution of 60 µm with a slice thickness of 200 µm on 40 slices, Acquisition Time = 2min and 25s). Then, a two-dimensional (2D) T1-weighted spin-echo sequence was acquired (TR/TE=1500/10.5 ms, Nex=2, Mtx=512*256, field-of-view=2.56*1.28 yielding an in-plane resolution of 50 µm with a slice thickness of 120 µm on 48 slices, Acquisition Time=12min and 48s) to distinguish vitreous from aqueous humour and allow detection of any leakage from one chamber to another. Finally, a high resolution 2D T2-weighted spin-echo sequence (TR/TE=4000/25.8 ms, Nex=1, Mtx=1024*512, field-of-view=3.17*1.58 cm yielding an in-plane resolution of 31 µm with a slice thickness of 120 µm on 48 slices, Acquisition Time=34min and 8s) was used to obtain a variety of ocular parameters. We measured axial length (AL), equatorial diameter (ED), anterior chamber depth (ACD), vitreous chamber depth (VCD), anterior chamber width (ACW), and lens

thickness (LT) as defined by Tkatchenko et al. 2010 (21). The ACD and ACW were used to calculate the corneal radius of curvature (CRC) as $CRC = (ACD/2) + (ACW^2/(8 \times ACD))$.

Surface tension: To calculate surface tension we applied the Laplace's law stating that the pressure exerted on a sphere equals the product of the pressure inside the sphere and its radius. Laplace's law also predicts that for a cylinder, superficial tensions depend on the product $T = \Delta P \times r$, where ΔP ($P_1 - P_2$) is the pressure difference across the retina (P_1 is the vascular pressure from the convex side, P_2 the intraocular pressure from the concave side) and r value is extracted from MRI data. In the present context this law predicts that the surface tension will be proportional to the radius size.

Topical endoscopy fundus imaging

Topical endoscopy fundus imaging (TEFI) was performed (22) with an endoscope with a 5-cm long otoscope with a 3-mm outer diameter (1218AA; Karl Storz, Tuttlingen, Germany) with step index lenses and an angle of view of 0° , a field of view of 80° in air, and a crescent-shaped illuminating tip. A reflex digital camera with a 6.1-million pixel charge-coupled device (CCD) image sensor (D50 with Nikkor AF 85 /F1.8 D objective; Nikon, Tokyo, Japan) was connected to the endoscope through an adapter containing a +5 lens (approximate value; the distance from the tip to the cornea appeared to have more influence on focus than did the lens power). The preferred settings of the camera are as follows: image format, raw; focus, manual; operating mode, A (priority to opening); diaphragm, 1/1.8; white balance, automatic. The light source was a xenon lamp (reference 201315-20; Karl Storz) connected through a flexible optic fiber to the endoscope.

Anterior Segment Examination

Anterior chamber phenotypes were assessed with a slit lamp (SL-D7, Topcon, Oakland, NJ) and photo-documented with a digital video camera (DV-3, Topcon). All images were taken using identical camera settings and prepared by processing with identical image software. All ocular examinations were performed on conscious mice.

Transmission Electron Microscopy

Adult mice were anesthetized and perfused transcardially with 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde in 0.1M PBS (pH 7.4). Retinas were sliced in 200- μ m-thick sections, postfixed 2 h in 1% osmium tetroxide, dehydrated in alcohol, cleared in acetone, and embedded in Epon. For light microscopy, transverse serial sections (1 μ m) were cut, heat dried, and stained with toluidine blue. Ultrathin sections were cut and stained with lead citrate and examined with a Philips (Aachen, Germany) CM100 electron microscope.

Vitreous humor collection

Vitreous gel and liquid vitreous humor were obtained as previously described (23, 24). Briefly one- and three-months-old mice were euthanized by CO₂ inhalation followed by decapitation. In a first set of experiments the sclera tissue posterior to the limbus was grasped and a microsurgical blade was used to make an incision in the cornea from limbus to limbus. The lens and the vitreous were eviscerated using a fine needle holder the vitreous was carefully dissected and analyzed (see below). The retina was similarly eviscerated through the corneal incision but only very low amounts of vitreous gel obtained were obtained. In another set of experiments the lens was carefully dissected to avoid excessive damage of the anterior vitreous body and lifted out of the eye. The eye was weighed, oriented superior-side up in a Petri dish and then sliced transversely (superior to the optic nerve) into two calottes to allow ready collection of the liquid vitreous in the Petri dish. In general around 9.3-9.5 mg of gel

and 2-2.5µl of liquid vitreous humor could be retrieved from each eye in control conditions. In mutant conditions around 9.5 mg of gel up to 20µl could be retrieved from each eye. When necessary vitreous humors were pooled and used for biochemical and proteomic analyses.

Protein analysis

Samples. Samples were stored at -80°C until analysed. Protein concentration of these samples was determined using the Bradford method. Twenty-five µg of samples were loaded in Laemmli buffer on polyacrylamide gels and allowed for a short period a migration (1 h30) in a stacking gel (7 %). After staining, the protein band was excised and the proteins within the bands were reduced in 5mM dithiothreitol and cysteins were irreversibly alkylated in 25 mM iodoacetamide. After washing steps with water, gel bands were submitted to protein digestion (trypsin from Promega, 0.5 µg per band). Several steps of peptide extraction were then performed in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ mixtures (50/50/1) and the peptide fractions were combined and evaporated.

Liquid nanochromatography and mass spectrometry. For each sample, peptides were dissolved in 0.1% formic acid in water. All experiments were carried out with a linear quadrupole ion trap-Orbitrap mass spectrometer (LTQ Orbitrap Elite, Thermo Scientific) equipped with a nano-ESI source and coupled to a nanoliquid chromatography (Easy-nLC II, Thermo Scientific). The sample was loaded onto an enrichment column (Cap Trap C_8 , 0.5 x 2 mm, Michrom Bioresources) and the separation was performed by using a reversed phase column (C_{18} , L153, ID 5µm, 100 Å pore size, Nikkyo Technos, Japan). The gradient (mobile phase A: $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ FA; mobile phase B: $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ FA) was delivered at a flow rate of 300 nl/min for 120 min. Tryptic peptides were eluted from the reverse-phase column into the mass spectrometer, using a linear gradient from 2% to 45% of B. The capillary voltage was set at 1.5 kV and the source temperature at 200 °C. The mass spectrometer was operated in

the data-dependent mode. Survey full scan mass spectra (from m/z 300 to 2000) were acquired in the Orbitrap with a resolution of 30,000. The mass spectrometer selected the 20 most intense ions for fragmentation.

Protein identification. Raw data files were processed using Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Scientific). Peak lists were searched using the MASCOT search engine (version 2.2, Matrix Science) against the SwissProt database. Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage sites allowed; variable modifications: carbamidomethylation of cysteine, and oxidation of methionine. The parent ion and daughter ion tolerances were 10 ppm and 0.5 Da, respectively. The results filtered to a 5% maximal false positive rate using a reverse database search approach. Peptide filters were high peptide confidence and proteins identification with at least 2 peptides.

Relative quantification by Progenesis LC-MS. Raw data were imported in Progenesis LC-MS software (v4.0.4441.29989). One sample was set as a reference, and the retention times of all other samples within the experiment were aligned. After alignment, data were normalized. Normalization results in a unique factor for each sample which corrects all peptides abundances in the sample. Statistical analysis was performed using normalized abundances for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. Features presenting p-value <0.05 and q-value <0.05 were selected. MS/MS spectra from selected peptides were exported from the Progenesis LC-MS software as a mgf file and used for peptide identification. Search parameters were identical to those described above when using Proteome Discoverer. Conflicting features were discarded for quantification. The total cumulative abundance of the protein was calculated by summing the abundances of all peptides.

SDS-PAGE and Western blot analysis. SDS-PAGE and immunoblotting were performed as previously described (25). Briefly 15 mg of vitreous gel or vitreous liquid were

separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking the membranes were incubated with the following primary antibodies: mouse anti-HSP25/27 (1/5000; SMC-163C/D, StressMarq), anti-HSP70 (1/5000; SMC-114C/D, StressMarq) and anti-collagen II (1/250; M2193, Santa Cruz), and rabbit anti-fibrillin (1/500; sc-20084, Santa Cruz), anti-LC3B (1/1000; #2775, Cell Signaling, MA 01915) and anti-Atg12 (1/1000; #2011, Cell Signaling), and goat anti-fibronectin (1/250; sc-6952, Santa Cruz). Mouse anti-GAPDH (1/500; SC-166545, Santa Cruz) was used as an internal control. Immunoblots were washed in TBS–0.02% Tween 20 (TBST), incubated for 1 h with the appropriate horseradish peroxidase-coupled IgG (diluted 1:5000), washed in TBS–0.02% Tween 20, revealed using Super Signal (Pierce, Rockford, IL), and exposed to Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Silver staining using the Biorad Silver Stain Plus kit was performed according to the manufacturer's instructions.

Blood sample collection and biochemical analyses

After an overnight fast, mice were shortly anesthetized with isoflurane (Forene^r, Abbot, France) and blood was collected at 9 a.m. by retro-orbital puncture. 300 µl of blood was collected into a heparinized tube for biochemical analysis. About 12 biochemical parameters were measured, including electrolytes and ions (sodium, potassium, chloride, calcium, iron) and other metabolites (creatinine, total protein, albumin, transferrin) in the blood as well as the liquid vitreous fraction. These parameters were determined using an Olympus AU 400 analyzer with kits and controls supplied by Olympus or other suppliers.

Data analyses and statistics.

Data are expressed as the means \pm s.e.m. Differences between the experimental groups were evaluated using ANOVA followed, when significant ($P < 0.05$), by the Tukey-Kramer test.

When only two groups were compared, Mann-Whitney or Student's t test was used as appropriate. The statistical analyses were performed using Graph Prism Software.

Results

Excessive bi-lateral eye enlargement in $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutants

Lrp2 is expressed in the eye primordium by E9.0 (26), as soon as the optic vesicle forms. Within the optic cup *Lrp2* displays a high-to-low dorsal-to-ventral gradient in the presumptive neural retina and retinal pigment epithelium (Figure 1A). After E15.5 the *Lrp2* signal is concentrated at the inner, nonpigmented, layer of the ciliary body epithelium whereas a low signal is also found at the outer, pigmented, layer of the ciliary body epithelium and the retinal pigment epithelium (Figure 1B). Other *Lrp2* expressing tissues during eye development include the cephalic neural crest cells (25) and the optic nerve astrocytes (27). Conditional inactivation of *Lrp2* in the neural crest, via *Wnt1-Cre*, or in the astrocytes, via *GFAP-Cre*, did not alter eye formation or retinal differentiation (Supplemental Figure 1) indicating that *Lrp2* expressed in these tissues was dispensable for eye morphogenesis.

To inactivate *Lrp2* in the forebrain including the neural retina and its distal edge where the ciliary body is located we used the *FoxG1.Cre* deleterious mouse strain active from E9.0 onward (15). Complete *Lrp2* ablation within the neural retina and the developing ciliary body was efficient by E12.5 (Figure 1 C, D). Homozygous *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant mice were viable and showed a striking bi-lateral eye enlargement (Figure 1E, F). High-resolution small animal magnetic resonance imaging (MRI) revealed that the excessive eye enlargement was associated with a shorter inter-ocular distance and that the space between the mutant eyeballs and the orbits was reduced especially at the posterior pole of the eye (Figure 1G-J). In addition to the ocular phenotype the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutants lacked a corpus callosum (arrows in Figure 1I, J), a feature reminiscent of the human DBS phenotype (8).

Excessive axial elongation and posterior pole degenerative changes in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eyes

To further characterize the mutant ocular phenotype we used the 11.7T MRI system to conduct longitudinal studies on control and mutant littermates from P15 onward (Figure 2A-N). Sequential, virtual sagittal slices through the optical axis of the eye of each mouse were acquired and used to extract various ocular parameters (21) including axial length (AL), equatorial diameter (ED), lens thickness (LT), vitreous chamber depth (VCD), anterior chamber depth (ACD) and corneal radius of curvature (CRC). We obtained similar values for LT, ACD and CRC in control and mutant eyes (Figure 2K, M, N). In contrast the AL, ED, VCD, asphericity coefficient, circumference and area values were dramatically increased in the mutants by post-natal day 15 (P15), age at which the mutant eye was already 24% longer than the control one, and later (Figure 2I, J, L and Supplemental Figure 2A-C). To analyze the rate of axial elongation we distinguished three different phases; phase 1 (P15-P21), phase 2 (P21-P90) and phase 3 (P90-P360). Phase 1 was characterized by a very rapid enlargement of the eyeball in both control and mutant mice; the growth rate was however much higher in the mutant (64 $\mu\text{m}/\text{d}$) than in the control eyes (42.4 $\mu\text{m}/\text{d}$). During phase 2 the mean growth rate dropped to 13.4 $\mu\text{m}/\text{d}$ in the mutants and 6.5 $\mu\text{m}/\text{d}$ in the controls, and further slowed to 0.3 $\mu\text{m}/\text{d}$ and 0.02 $\mu\text{m}/\text{d}$ respectively in phase 3. The very rapid increase in AL during phase 1 was associated with a much higher VCD growth rate in the mutants (39.4 $\mu\text{m}/\text{d}$) compared with the controls (8.1 $\mu\text{m}/\text{d}$). In phase 2 the VCD mean growth rate decelerated in both control and *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* eyes but remained two-fold higher in the mutants; in phase 3 a very slow increase in VCD (0.07 $\mu\text{m}/\text{d}$) was still recorded exclusively in the mutants. In agreement with early onset and continuous extension of the ocular axis posterior staphyloma could systematically be evidenced from P21 onward on histological as well as MRI sections of the mutant eyes (Supplemental Figure 2D, E and Figure 2E-H).

Further ophthalmological examination confirmed the MRI data and showed that the anterior segment was generally normal in the mutants (Figure 3A-B') although occasionally

pupillary ectopia could be observed (Figure 3C, C'). Topical endoscopy fundus imaging at P60 (Figure 3D, E) and P180 (Figure 3F, G), when the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eye was respectively 30% and 40% longer than the control one revealed progressively aggravating chorioretinal atrophy and peripapillary staphyloma, traits of the so-called myopic maculopathy (28, 29). Tonometry evaluation showed that at these ages the intraocular pressure (IOP) of the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} eyes was similar to the controls whereas after P180 slightly lower IOP values were obtained in the mutants (Figure 3H). The calculated surface tension in the mutant retina was however progressively increasing from P60 onward and was 150% the control values around P180 (Figure 3I). The above results all-together clearly show that the lengthening of the ocular axis in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants is primarily due to continuous vitreal chamber enlargement and that it is accompanied by progressively developing myopic maculopathy.

Normal eye development and early post-natal onset axial elongation in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes

In highly myopic patients the excessive axial elongation of the eye may be observed early in life and is associated with retinal thinning at both the periphery and posterior pole (5, 29, 30). In agreement with this retinal thinning could be seen on the MRI sections of the enlarged mutant eyes from P21 onward (Figure 2A-H). To identify the onset of eye enlargement and characterize the mutant retinal morphology we used histological sections of control and mutant eyes at various developmental and post-natal stages.

Eye size and retinal morphology appeared normal in the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants between E13.5 and P5 (Figure 4A and Supplemental Figure 3). From P7 onward however significantly increased axial length and decreased retinal thickness were evident. At P90 the mutant retina thickness did not exceed 10% of the control value (Figure 4B, C) and this

decrease was due to the marked thinning of the inner nuclear (INL), inner plexiform and outer nuclear (ONL) layers (Figure 4D-F). To investigate whether retinal thinning was associated with differentiation and/or lamination defects we analyzed the expression of various retinal markers at both pre- and post-natal stages. The distribution of Otx2, Pax6 and Tuj1, markers which label retinal progenitors, including ganglion cells, and/or RPE cells was not modified in the developing mutant retina between E13.5 and E19.5 (Supplemental Figure 3A-C). Moreover, the differentiated retina cell markers Brn3a, PKC α , PNA-Lectin and Aquaporine 4 were similarly distributed in the retinal ganglion, bipolar, photoreceptor and Müller cells (Figure 4G, H). The above results indicate that despite early onset and excessive thinning the differentiation and lamination of the mutant retina were preserved.

Increased cell-death contributes to excessive retinal thinning in $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant mice

To investigate whether decreased retinal cell density was contributing to retinal thinning in the mutants we compared the number of cells in control and mutant ganglion (GCL), ONL and INL cell layers using bins of 40,000 square millimeters. From P15 onward progressively decreasing cell density was observed in the mutant GCL and INL whereas in the mutant ONL cell density was already decreased at P7 (Figure 5A). Decreased cell density is generally due to insufficient cell proliferation and/or increased cell death and probably reflects the higher mechanical force to which the retina of the elongated eye is subjected (Figure 3I) and (31). We therefore analyzed the expression of cell proliferation and death markers at various developmental and post-natal stages. The M-phase cell cycle marker phospho-histone H3 (PH3) was normally distributed in the mutant retinal progenitor cells (Figure 5B, C and Supplemental Figure 4A). Furthermore the number of PH3 expressing cells was similar in control and mutant retinas and the cell proliferation rate was not modified in the mutants between E13.5 and P5 (Figure 5D).

To assess cell death we used TUNEL staining. In control retinas the number of TUNEL positive cells increased until P7 and then progressively declined to reach basal levels around P21 (Figure 5E upper panel, F and Supplemental Figure 4B upper panel). Compared with the controls the number of TUNEL positive cells was not modified in the mutants, prior to P1 (Supplemental Figure 4B lower panel). It was however significantly higher in the mutant retinas between P5 and P21, especially in the INL, ONL and inner plexiform cell layers (Figure 5E lower panel, F). To identify the mechanism of retinal cell death we quantified the signal of the apoptosis marker activated caspase 3. In control retinas cell death was largely accounted for by apoptosis (Figure 5G upper panel, H). Although a high activated caspase 3 signal was also observed in the mutant retinas (Figure 5G lower panel, H), apoptosis did not appear to be the only process of cell death. Because the overstretched mutant retina is subjected to higher mechanical forces we compared the expression of stress-related markers in control and mutant eyes. Increased expression of the heat shock protein Hsp70 (32) in the mutant retinas (Figure 5I) suggested that chaperone-mediated autophagy might contribute to cell death in the mutants. This hypothesis was also supported by the high expression level of markers widely used to monitor autophagic activity (26, 27) including Hsp25/27, the autophagosome marker microtubule-associated protein light chain LC3B-II and the autophagy-related gene Atg12 exclusively in the mutant retina (Figure 5J). Finally GFAP, another stress-related marker that labels the astrocytes was strongly expressed in the mutant ganglion cell layer further suggesting that retinal thinning and retinal cell death, at least partly due to constant mechanical stress were associated events in the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* eye (Supplemental Figure 5A, B).

Cell death was only occasionally observed in control retinas after P21. In the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant retinas however, cell death appeared to increase especially in the mutant ganglion cell layer and consequently led to a progressive reduction of the number of

axons in the mutant optic nerve (Supplemental Figure 5C). It is interesting to note that despite the important reduction of the number of axons in the mutant optic nerve at P150 the optic nerve diameter was not modified in the mutants (Supplemental Figure 5D).

Scleral modifications in $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant mice

The sclera, the outer coat of the eye, is a collagen and proteoglycan containing connective tissue with flattened fibroblasts embedded in it. Thinning of the sclera, in particular at the posterior pole of the eye and the ensuing posterior staphyloma, an outward protrusion of all posterior layers, are typical features of myopic maculopathy (6, 33).

At the posterior pole of control P90 eyes the mean scleral thickness was around 35 μ m (Figure 6A) as previously reported (28). At this age the scleral thickness of the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eyes was reduced by 33% (Figure 6B and Supplemental Figure 6A) whereas at P180 the mutant sclera was 50% thinner than the control one (Supplemental Figure 6A).

Ultrastructural analysis revealed that while in the control sclera collagen fibrils were organized into well-defined lamellae (Figure 6C) the mutant collagen fibrils formed fewer lamellae which appeared disorganized (Figure 6D and Supplemental Figure 6B). Within the mutant lamellae the organization of the collagen fibrils was also perturbed; interweaving fibrils, readily observed in the controls, were only occasionally seen throughout the mutant sclera (Supplemental Figure 6C-J). The mutant fibrils seemed to course parallel to each other and large areas devoid of fibrils were often found between the lamellae of the inner, middle and outer sclera (Supplemental Figure 6C-H). Moreover the mutant fibrils appeared abnormally drawn compared with the controls (Supplemental Figure 6I, J). Quantification of the scleral fibrils showed that in control eyes the density per square millimeter increased with age and that it was higher in the outer sclera. The fibril density was significantly lower in the

mutants and, in contrast with the controls, progressively decreased in the direction of the inner-to-outer sclera (Figure 6E).

The morphology of the mutant fibrils was very heterogeneous even within a single region of the sclera and their contour was irregular with rectangular- rather than oval-shaped fibrils readily found throughout the mutant sclera (Figure 6F-I). In control eyes the majority of collagen fibrils from the outer, middle and inner layers of the posterior sclera had a mean cross-sectional diameter of ~115 nm (Figure 6J). Compared with the controls the mean cross-sectional diameter of the mutant fibrils was drastically modified in the three scleral layers (Figure 6K). It was of ~135 nm in the inner and middle scleral layers and ~120 nm in the outer layer. The frequency however of fibers with both smaller (<60 nm) and wider (>180 nm) mean cross-sectional diameters was increased in the mutants (Figure 6K). The above results indicate that the posterior mutant sclera undergoes important structural modifications reminiscent of human HM (34) and consistent with the development of posterior scleral staphyloma.

Impaired liquid vitreous composition in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutants

The vitreous humor is a highly hydrated gelatinous structure composed of both collagenous and non-collagenous constituents including electrolytes and several proteins. The human vitreous humor undergoes an inevitable process of liquefaction that appears around the age of four years and generally progresses slowly after the midlife (35–38). In highly myopic eyes, including in Stickler syndrome, liquid vitreous is formed earlier and quantitatively increases with the degree of myopia (17, 32, 33). Although this process is well described the composition of the liquid vitreous in myopic patients remains unknown. To assess potential liquefaction we measured the mass of the gel-like fraction of the vitreous relative to the liquid fraction in control and $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eyes as previously described (24). We did not

observe any noticeable difference in the weight (around 9.5 mg in both control and mutants) or composition of the gel-like fraction between control and *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* eyes neither at P30 or P90 (Supplemental Figure 7A). The volume of the liquid fraction was however increased in the mutants at both ages and was 7-fold higher at P90. We used the liquid vitreous fraction (LVF) to analyze the concentration of soluble constituents including sodium, potassium, chloride and iron (Table 1) in control and mutant mice at P30 and P90 and compared them to their respective serum levels. As expected and in accordance with published results (39) the concentration of the circulating electrolytes was similar in control and mutant mice (Table 1). In the mutant LVF however, the concentration of sodium, potassium and chloride was impaired at both ages and resulted in a two-fold increase of the sodium potassium ratio at P90. At the same age the concentration of iron was strongly increased in the mutants whereas the levels of lactate and glucose were not modified (Table 1). Finally, the osmolality of the mutant LVF was lower than that of the controls (307.8 mosm/L versus 346.1 mosm/L) and the total protein concentration of the control and mutant LVF was of 1.4 g/L and 3.9 g/L respectively.

To further investigate the differentially expressed proteins in the control and mutant LVF at P90 we used label-free liquid nano chromatography-mass spectrometry analysis. Using highly stringent criteria (at least two unique matched peptides for each protein and an adjusted P value >>0.05) we identified 495 differentially expressed proteins (Supplemental Table 1) extending thus previous reports on normal human and mouse vitreous composition (40, 23, 41, 42). A surprisingly low number of proteins were significantly, although moderately, overexpressed in the mutant vitreous including the here identified serine protease inhibitor gene family member SPA3K (Table 2). The levels of alpha1-antitrypsin and of the nutrient transport proteins apolipoprotein A-I, albumin and transferrin were also increased in the mutants appearing thus as the predominant contributors of the increased protein content.

The major finding however was the strong reduction of various proteins involved in normal eye development, response to hydrogen peroxide, to reactive oxygen species and to oxidative stress such as alpha-, beta- and gamma- crystallin isoforms or vimentin (Table 3). Direct biological interaction networks were assembled from over- and under-expressed proteins in the mutant LVF (Figure 7). Overexpressed proteins formed a network centered on albumin, the most abundant vitreous protein (43) involved in cell homeostasis (Figure 7A). Groups of strongly reduced, co-regulated interacting proteins were formed around the structural proteins beta-crystallin A1, cytoplasmic actin and α - and β -tubulin subunits necessary for ocular tissue remodeling and transepithelial transport of water, ions and macromolecules including albumin (44, 45) (Figure 7B). A simple network was finally formed between phosphoglyceratemutase 1 and peroxiredoxin family members, proteins implicated in ocular tissue metabolism (Figure 7B).

Similarly expressed proteins in the control and mutant LVF included trypsin and proteins involved in immunological responses such as the complement members C3, C4b, C8, C9, complement factor B or retinol (42, 46, 47), suggesting that the immunological status of the mutant LVF was preserved. The above results clearly show that the volume of liquid vitreous is strongly increased in the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} eyes and provide the first differential analysis of its biochemical composition.

Discussion

HM is a frequent cause of secondary visual disturbance mainly due to myopic maculopathy or retinopathy the major cause of legal blindness in the world (3, 29). Several genes including *Lrp2* have been associated with syndromic or isolated forms of HM (2, 8, 9) but their implication in the pathogenesis of HM and its complications remains unclear. Here we show that the forebrain specific inactivation of *Lrp2* affects post-natal eye development and leads to early onset, bi-lateral, continuous and excessive axial eye growth essentially through elongation of the vitreal chamber. The mutant eyes progressively develop a spectrum of changes characteristic of myopic maculopathy comprising severe retinal damage, chorioretinal atrophy and peripapillary staphyloma.

Whereas *Lrp2* inactivation in the neural crest, *via Wnt1-Cre*, or the optic nerve and retinal astrocytes *via GFAP-Cre* did not alter eye morphogenesis, *FoxG1*-mediated ablation of *Lrp2* dramatically modified post-natal eye development identifying *Lrp2* expressed in the anterior neuroepithelium as an essential regulator of eye growth. Despite excessive lengthening of the ocular axis the growth and overall morphology of the anterior segment were normal in the mutants as suggested by normal CRC, ACD and LT values as well as unmodified pupil size. Furthermore we did not find any sign of cataract in the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant eyes at least during the first six months of life. The occasionally observed papillary ectopia may be secondary to a detachment of the ciliary body due to the excessive elongation-associated traction.

Whereas pre-natal eye growth is normal in the *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant eyes, posterior segment anomalies, namely increased axial elongation and retinal thinning could be evidenced as soon as P7 when the eye-lids are still closed and the retina does not process visual information, strongly suggesting that the onset of abnormal eye-growth is non-visually

driven in the mutants. However, continuous elongation and the ensuing mechanical stretching may not be the only cause of the retinal damage evidenced in fundus imaging of P60 mutant eyes. An excessive mechanical load may indeed induce retinal cell death *via* increased autophagy. Autophagic markers were quasi undetectable in control retinas but strongly expressed in the mutant retina suggesting that impaired autophagy may eventually contribute to retinal thinning and degeneration. Whereas increased autophagy may temporarily be protective it is likely that the exposition of the ocular tissues to continuous insults affects their capacities of autoregulation. Our biochemical and proteomic data support this hypothesis. The expression of various crystalline isoforms known to protect ocular tissues against mechanical and metabolic stresses (48–50) and to be required for retinal tissue repair is extremely low. Furthermore the concomitant, although less pronounced decrease in peroxiredoxin family members and the abnormally elevated amount of iron in the mutant vitreous may also reflect impaired protection from oxidative damage and affected survival properties of the mutant retinal cells. Finally, because of its consistence the mutant liquid vitreous may be less protective and facilitate the rapid distribution of reactive oxygen species within the ocular tissues (51) potentially contributing to the degenerative damage observed. We therefore assume that the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant retina is one of the primarily affected ocular tissues and that both continuous mechanical strain and oxidative damage may together contribute to the chorioretinal atrophy, ganglion cell death and decrease of the number of axons in the optic nerve.

Mutant scleral thinning is first evident around P21 suggesting that scleral modifications are the consequence rather than the cause of the excessive axial elongation in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants. Although the study of the biomechanical properties of the mutant sclera is beyond the scope of the present work one would anticipate that scleral thinning, impaired collagen fibril number and morphology may increase scleral extensibility in

response to the imposed mechanical stretching and thus favor the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eye enlargement and formation of peripapillary staphyloma. Increased scleral extensibility may also at least partly explain the physiological intraocular pressure observed in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eyes as well as in highly myopic patients (16).

The cause of excessive axial elongation in HM remains unclear but experimentally induced vitreous liquefaction was shown to result in vitreal chamber enlargement reminiscent of HM (52, 53). Furthermore a significant increase of the volume of liquid vitreous and impaired vitreous electrolyte balance have previously been associated with form-deprivation induced myopia (54). In agreement with these observations the volume of the LVF was strongly increased in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eyes and the ionic composition and osmolality of the mutant LVF were impaired. The serum values of both control and mutant mice being similar it is unlikely that the differences observed are due to systemic anomalies. Furthermore the levels of the various vitreous electrolytes were variably increased, decreased or unmodified strongly suggesting impaired intra-ocular production and/or transport.

Physiologically occurring vitreous liquefaction is a poorly understood remodeling process associated with an increase in the total soluble protein concentration assumed to result from an age-related ocular barrier disruption (35). We cannot exclude that leakage of serum proteins may partly explain the progressive increase of soluble protein content in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant LVF between P30 and P90. However, the moderately elevated levels of albumin, transferrin and apolipoprotein A-I contrast with the significantly decreased or unmodified transthyretin and retinol levels in the mutant LVF at P90 arguing against serum protein leakage as a main contributor of the soluble LVF content.

Degradation of collagenous and non-collagenous vitreous components mediated by matrix metalloproteinases (MMPs) and trypsin (55–57) may contribute to vitreous

liquefaction in HM. We did not identify any collagen breakdown products in the LVFs analyzed but our proteomic approach was not designed to this end. We neither found any differential expression of enzymes such as MMPs or trypsin and the mass and general biochemical composition of the gel-like vitreous fraction was not modified suggesting that vitreous degradation was not enhanced in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutants.

In highly myopic patients the presence of liquid vitreous is frequently combined with posterior vitreous detachment (PVD) i.e. separation between the vitreous cortex and the retina, which generally increases the risk for degenerative eye changes (17, 51, 58, 59). It is possible that PVD occurs in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutant eyes but due to their extreme deformation *in vivo* imaging using slit-lamp microscopy or optical coherence tomography (OCT) could not be performed. However the detection of the central optico-lenticular Cloquet's canal on the MRI sections between P21 and P360 suggests that at least complete PVD may not be frequent in the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutants.

Cloquet's canal was believed to be a remnant of the primary vitreous but recent reports suggest that it may serve as a route by which aqueous humor flows into lacunae of the posterior vitreous containing liquid vitreous (38, 60). In this context it is interesting to note that the most important increase in axial and vitreal chamber enlargement rates, in both control and mutant eyes were observed between P15 and P21, soon after the ciliary body, the source of the aqueous humor, becomes fully differentiated (61). Furthermore the aqueous-like consistence of the mutant LVF may also suggest that aqueous humor could continuously drain in the mutant vitreal chamber and contribute to excessive eye enlargement.

In sum the present work shows that $Lrp2$ expressed in the anterior neuroepithelium is required for normal eye growth and that the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutants are, to the best of our knowledge, the first animal model to faithfully summarize congenital HM. Because the

pathological significance of HM is not due to ametropia but rather the development and extent of the associated degenerative changes we believe that the $Lrp2^{FoxG1.cre-KO}$ mutants provide a unique tool to study the onset and age-related evolution of high myopia.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INSERM, CNRS, UPMC, LABEX-LIFESENCES and SANOFI.

Bibliography

1. Flitcroft DI. Is myopia a failure of homeostasis?. *Exp. Eye Res.* 2013;114:16–24.
2. Hawthorne FA, Young TL. Genetic contributions to myopic refractive error: Insights from human studies and supporting evidence from animal models. *Exp. Eye Res.* 2013;114:141–149.
3. Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw S-M. Myopia. *Lancet* 2012;379(9827):1739–1748.
4. Meng W, Butterworth J, Malecaze F, Calvas P. Axial length of myopia: a review of current research. *Ophthalmol. J. Int. Ophthalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Für Augenheilkd.* 2011;225(3):127–134.
5. Lai TYY, Fan DSP, Lai WWK, Lam DSC. Peripheral and posterior pole retinal lesions in association with high myopia: a cross-sectional community-based study in Hong Kong. *Eye Lond. Engl.* 2008;22(2):209–213.
6. Mitry D, Zambarakji H. Recent trends in the management of maculopathy secondary to pathological myopia. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 2012;250(1):3–13.
7. Pardue MT, Stone RA, Iuvone PM. Investigating mechanisms of myopia in mice. *Exp. Eye Res.* 2013;114:96–105.

8. Kantarci S et al. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat. Genet.* 2007;39(8):957–959.
9. Schrauwen I et al. Broadening the phenotype of LRP2 mutations: a new mutation in LRP2 causes a predominantly ocular phenotype suggestive of Stickler syndrome. *Clin. Genet.* 2014;86(3):282–286.
10. Veth KN et al. Mutations in zebrafish *lrp2* result in adult-onset ocular pathogenesis that models myopia and other risk factors for glaucoma. *PLoS Genet.* 2011;7(2):e1001310.
11. Spoelgen R et al. LRP2/megalyn is required for patterning of the ventral telencephalon. *Dev. Camb. Engl.* 2005;132(2):405–414.
12. Amsellem S et al. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 2010;21(11):1859–1867.
13. Storm T, Heegaard S, Christensen EI, Nielsen R. Megalin-deficiency causes high myopia, retinal pigment epithelium-macromelanosomes and abnormal development of the ciliary body in mice. *Cell Tissue Res.* 2014;358(1):99–107.
14. Tallquist MD, Soriano P. Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genes. N. Y. N 2000* 2000;26(2):113–115.
15. Hébert JM, McConnell SK. Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev. Biol.* 2000;222(2):296–306.
16. Patel N, Hejkal T, Katz A, Margalit E. Ocular manifestations of Donnai-Barrow syndrome. *J. Child Neurol.* 2007;22(4):462–464.
17. Hlekamp NM. The vitreous gel: more than meets the eye. *Am. J. Ophthalmol.* 2010;149(1):32–36.

18. Chai Y et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 2000;127(8):1671–1679.
19. Zhuo L et al. hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genes. N. Y. N* 2000 2001;31(2):85–94.
20. Leheste JR et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2003;17(2):247–249.
21. Tkatchenko TV, Shen Y, Tkatchenko AV. Analysis of postnatal eye development in the mouse with high-resolution small animal magnetic resonance imaging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51(1):21–27.
22. Paques M et al. Panretinal, high-resolution color photography of the mouse fundus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48(6):2769–2774.
23. Skeie JM, Mahajan VB. Proteomic interactions in the mouse vitreous-retina complex. *PloS One* 2013;8(11):e82140.
24. Harocopos GJ et al. Importance of vitreous liquefaction in age-related cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45(1):77–85.
25. Cases O et al. Cubilin, a high affinity receptor for fibroblast growth factor 8, is required for cell survival in the developing vertebrate head. *J. Biol. Chem.* 2013;288(23):16655–16670.
26. Christ A et al. LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Dev. Cell* 2012;22(2):268–278.
27. Ortega MC et al. Megalin mediates the influence of sonic hedgehog on oligodendrocyte precursor cell migration and proliferation during development. *Glia* 2012;60(6):851–866.

28. Vongphanit J, Mitchell P, Wang JJ. Prevalence and progression of myopic retinopathy in an older population. *Ophthalmology* 2002;109(4):704–711.
29. Ouyang P-B, Duan X-C, Zhu X-H. Diagnosis and treatment of myopic traction maculopathy. *Int. J. Ophthalmol.* 2012;5(6):754–758.
30. Bansal AS, Hubbard GB. Peripheral retinal findings in highly myopic children < or =10 years of age. *Retina Phila. Pa* 2010;30(4 Suppl):S15–19.
31. Meskauskas J, Repetto R, Siggers JH. Shape change of the vitreous chamber influences retinal detachment and reattachment processes: is mechanical stress during eye rotations a factor?. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(10):6271–6281.
32. Chen Y et al. Autophagy protects the retina from light-induced degeneration. *J. Biol. Chem.* 2013;288(11):7506–7518.
33. McBrien NA. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta. *Exp. Eye Res.* 2013;114:128–140.
34. Curtin BJ, Iwamoto T, Renaldo DP. Normal and staphylomatous sclera of high myopia. An electron microscopic study. *Arch. Ophthalmol.* 1979;97(5):912–915.
35. Sebag J. Ageing of the vitreous. *Eye Lond. Engl.* 1987;1 (Pt 2):254–262.
36. Le Goff MM, Bishop PN. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye Lond. Engl.* 2008;22(10):1214–1222.
37. Filas BA, Zhang Q, Okamoto RJ, Shui Y-B, Beebe DC. Enzymatic degradation identifies components responsible for the structural properties of the vitreous body. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(1):55–63.

38. Li D, Kishi S, Itakura H, Ikeda F, Akiyama H. Posterior precortical vitreous pockets and connecting channels in children on swept-source optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(4):2412–2416.
39. Champy M-F et al. Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 2008;19(5):318–331.
40. Wu CW, Sauter JL, Johnson PK, Chen C-D, Olsen TW. Identification and localization of major soluble vitreous proteins in human ocular tissue. *Am. J. Ophthalmol.* 2004;137(4):655–661.
41. Koss MJ et al. Proteomics of vitreous humor of patients with exudative age-related macular degeneration. *PloS One* 2014;9(5):e96895.
42. Murthy KR et al. Proteomic analysis of human vitreous humor. *Clin. Proteomics* 2014;11(1):29.
43. Gao B-B, Chen X, Timothy N, Aiello LP, Feener EP. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J. Proteome Res.* 2008;7(6):2516–2525.
44. Osicka TM et al. Ramipril prevents microtubular changes in proximal tubules from streptozotocin diabetic rats. *Nephrol. Carlton Vic* 2003;8(4):205–211.
45. Sinha D et al. betaA3/A1-crystallin in astroglial cells regulates retinal vascular remodeling during development. *Mol. Cell. Neurosci.* 2008;37(1):85–95.
46. Yoshimura T et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PloS One* 2009;4(12):e8158.
47. Walia S, Clermont AC, Gao B-B, Aiello LP, Feener EP. Vitreous proteomics and diabetic retinopathy. *Semin. Ophthalmol.* 2010;25(5-6):289–294.

48. Böhm MRR et al. Crystallin- β -b2-overexpressing NPCs support the survival of injured retinal ganglion cells and photoreceptors in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(13):8265–8279.
49. Piri N, Kwong JMK, Caprioli J. Crystallins in retinal ganglion cell survival and regeneration. *Mol. Neurobiol.* 2013;48(3):819–828.
50. Thanos S et al. Role of crystallins in ocular neuroprotection and axonal regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 2014;42:145–161.
51. Holekamp NM, Harocopos GJ, Shui Y-B, Beebe DC. Myopia and axial length contribute to vitreous liquefaction and nuclear cataract. *Arch. Ophthalmol.* 2008;126(5):744; author reply 744.
52. Halfter W, Winzen U, Bishop PN, Eller A. Regulation of eye size by the retinal basement membrane and vitreous body. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(8):3586–3594.
53. Halfter W. Change in embryonic eye size and retinal cell proliferation following intravitreal injection of glycosaminoglycans. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49(8):3289–3298.
54. Seko Y, Shimokawa H, Pang J, Tokoro T. Disturbance of electrolyte balance in vitreous of chicks with form-deprivation myopia. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2000;44(1):15–19.
55. Los LI, van der Worp RJ, van Luyn MJA, Hooymans JMM. Age-related liquefaction of the human vitreous body: LM and TEM evaluation of the role of proteoglycans and collagen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44(7):2828–2833.
56. Van Deemter M et al. Enzymatic breakdown of type II collagen in the human vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50(10):4552–4560.
57. Van Deemter M et al. Trypsin-mediated enzymatic degradation of type II collagen in the human vitreous. *Mol. Vis.* 2013;19:1591–1599.

58. Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, McLeod D, Bos KJ. Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45(4):1041–1046.
59. Sebag J. Pharmacologic vitreolysis--premise and promise of the first decade. *Retina Phila. Pa* 2009;29(7):871–874.
60. Kishi S, Shimizu K. Posterior precortical vitreous pocket. *Arch. Ophthalmol.* 1990;108(7):979–982.
61. Napier HRL, Kidson SH. Proliferation and cell shape changes during ciliary body morphogenesis in the mouse. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2005;233(1):213–223.

Figure Legends

Figure 1.

Lrp2-deficient eyes are abnormally enlarged. Lrp2 is expressed in the developing neuroretina (nr) at E12.5 (**A**). From E15.5 onward the signal is restricted in the lens (L) facing inner layer of the ciliary body (cb) epithelium, a low expression is also seen in the outer layer of the CB and in the retinal pigmented epithelium (rpe) (**B**). Loss of Lrp2 signal in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants at E12.5 and E15.5 (**C, D**). Sagittal cryosections through the developing eye (**A-D**). The *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants display bilateral eye enlargement (**E, F**). The inter-ocular distance as well as the retro-ocular space (double-headed arrows in **G-J**) are decreased in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants. The corpus callosum (arrow in **I, J**) is not formed in the mutants. Horizontal MRI sections through the eyes and the corpus callosum of control and mutant mice (**G-J**). (vz) ventricular zone. Scale bars: 25 µm in A-D.

Figure 2.

MRI analysis of post-natal eye growth in control and *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutants over the first year of life. High resolution sagittal slices through the optical axis of the right eye of each mouse were acquired (**A-H**). A variety of optical parameters were extracted from the MRI images collected from groups of control and mutant mice at the ages indicated (**I-N**); Values are mean ± SEM of 4 animals per age; ***p<0.01.

Figure 3.

Ophthalmological evaluation of control and mutant mice. Similar gross morphology of the anterior segment in control (**A, A'**) and *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant littermates (**B, B'**). In some cases pupillary ectopia was observed in the mutants (**C, C'**). Fundus photographs of control (**D, F**) and mutant eyes (**E, G**) at P60 (**D, E**) and P180 (**F, G**) respectively show progressively

developing chorioretinal atrophy and peripapillary staphyloma. Similar intraocular pressure in groups of control and mutant littermates at the ages indicated (**H**). Increased surface tension in the mutant retinas at the ages indicated calculated as described (**I**); Values are mean \pm SEM of 10 animals per age.

Figure 4.

Histological and immunomorphological analysis of post-natal eye growth. Significantly increased axial length is first observed at P7 (**A**). The retinal lamination in P90 *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes is normal; Nissl staining of retinal layers (**B**). The continuous reduction of the retinal thickness between P7 and P90 (**C**) is mainly due to the thinning of the inner nuclear (INL), inner plexiform (IPL) and outer nuclear (ONL) cell layers (**D-F**). The distribution of the typical retinal markers Brn3a, PKC α , PNA-Lectin (PNA-L) and Aquaporine 4 (Aq4) in the retinal ganglion, bipolar, photoreceptor and Müller cells respectively is similar in control (**G**) and mutant littermates (**H**). The number of PKC α , PNA-L and Aq4 positive cells is apparently decreased in the mutants. Values are mean \pm SEM of 10 animals per age; ***p<0.01, **p<0.05, *p<0.1. Scale bars: 50 μ m in B, G, H.

Figure 5.

Decreased retinal cell density is associated with increased cell death in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes. The retinal cell density is reduced in the ONL, INL and GCL from P7 onward (**A**). The PH3 + cells are similarly distributed in control (**B**) and mutant retinal layers at P3 (**C**). Similar proliferation rates in control and mutant retinas between E13.5 and P5 (**D**). In normal retinas TUNEL + cells are essentially seen in the INL and to a lesser extent in the ONL and GCL layers (**E**, upper panel). In the mutants the TUNEL signal appears stronger in the INL, ONL and IPL (**E**, lower panel). Cell death is significantly increased in the mutants between P5 and P21 (**F**). Distribution of caspase 3+ apoptotic cells in control and mutant retinas at P7 and P21

(G). Apoptosis is also increased in the mutants (H). The expression of the marker of autophagy Hsp70 is particularly strong in the mutant INL (I). Western-blot analysis of the indicated autophagic markers; GAPDH is used as an internal loading control (J). Values are mean \pm SEM of 5 animals per age; *** $p < 0.01$. Scale bars: 50 μm in B, C, I; 30 μm in E, G.

Figure 6.

Scleral modifications in the in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes. Nissl staining of retinal sections in control (A) and mutant (B) eyes shows reduced scleral thickness at P90. Cross section across the entire posterior sclera (C, D) shows that the collagen fibrils form well-organized lamellae in the control sclera (C); in the mutant fibril-poor areas and impaired packing are evident (D). Contrary to the control sclera the collagen fibril density is lower in the outer layer of the mutant sclera (E). Fibril organization within a lamella of the posterior sclera (F, H) and in localized areas (G, I) of control (F, G) and mutant (H, I) scleras shows irregular fibril morphology and heterogeneous fibril diameter in the mutants. Measurements of cross-sectional diameters of fibrils from the inner, middle and outer posterior sclera in control (J) and mutant eyes (K). The mean fibril diameter distribution is modified in the mutants in all three layers; the frequency of very small as well large diameter fibrils is increased. (fb) fibroblast, (Lg) longitudinal and (Tr) transversal orientation of the cross-sectioned fibrils. Values are mean \pm SEM of 3 animals per age; *** $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, * $p < 0.1$. Scale bars: 50 μm in A, B; 3.5 μm in C, D; 1.2 μm in F, H; 300 nm in G, I.

Figure 7.

Interactome (protein-protein) interaction of proteins differentially expressed in *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes. The protein-protein interaction network of proteins overexpressed in mutant mice (A) and in control mice (B) was constructed using String software (version 9.1, www.string-db.org). Colored lines indicate different sources of evidence for each interaction.

The red circle represents proteins involved in normal mammalian eye development, green circles represent proteins involved in hydrogen peroxide responses.

Table 1. Ionic composition of control and mutant liquid vitreous fraction at P30 and P90. At P90 the total LVF volume was of 2.5 μ l and 17 μ l in control and mutants respectively. The number of animals used is indicated.

	Plasma		Vitreous chamber		Vitreous chamber	
	P90		P30		P90	
	Control (n = 8)	Mutant (n = 7)	Control (n = 80)	Mutant (n = 8)	Control (n = 30)	Mutant (n = 7)
Sodium mmol/L	147.2 \pm 1.6	148.5 \pm 1	167	158	167	154
Potassium mmol/L	6.05 \pm 0.8	5.7 \pm 0.3	16.6	11.2	17	7.6
Chloride mmol/L	111.2 \pm 0.2	114.4 \pm 1.3	144	132	144	128
Total protein g/L	45.2 \pm 1.4	44.1 \pm 1.1	1.3	1.2	1.4	3.9
Albumin g/L	26.8 \pm 0.9	28 \pm 0.5	0.6	0.6	0.28	0.979
Calcium mmol/L	2.31 \pm 0.04	2.31 \pm 0.05	0.25	0.4	0.3	0.82
Iron μ mol/L	25 \pm 2.1	27.1 \pm 3	~0	1.8	~0	2.2
Transferrin g/L	0.85 \pm 0.09	0.81 \pm 0.07	~0	~0	~0	0.13
Phosphorus mmol/l	2.01 \pm 0.06	2.07 \pm 0.07	0.97	1.25	1	2.41
Lactate mmol /l	4.5 \pm 0.6	4.7 \pm 0.7	10.7	9.6	9.5	10.2
Glucose mmol/l	5.8 \pm 0.27	6.2 \pm 0.2	6.11	5.84	6.23	6.05
Urea m mol/l	11.6 \pm 0.2	11.1 \pm 0.5	10.9	9.6	10.6	8.9
Osmolality mosm/l	287.3	289.3	345.8	318.3	346.1	307.8

Values are means \pm SEM of plasma clinical chemistry results.

Table 2. Proteins overexpressed in the liquid vitreous proteome of *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant compared to control eyes. The average number of unique total peptides detected in each group and the max fold change are indicated.

Accession	Description	Peptide count	Confidence score	Anova (p)	Max fold change
TRFE_MOUSE	Serotransferrin precursor	3	93,15	2,36E-04	2,23
SPA3K_MOUSE	Serine protease inhibitor A3K precursor	4	167,51	2,80E-03	4,47
ALBU_MOUSE	Serum albumin precursor	3	231,97	6,60E-05	2,07
A1AT4_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-4 precursor	2	94,37	4,21E-03	2,02
A1AT2_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-2 precursor	2	73,38	1,39E-03	2,96
A1AT1_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-1 precursor	3	139,91	3,22E-03	2,32

Table 3. Proteins overexpressed in the liquid vitreous proteome of control compared to *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant eyes. The average number of unique total peptides detected in each group and the max fold change are indicated.

Accession	Description	Peptide count	Confidence score	Anova (p)	Max fold change
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1	2	50,91	3,08E-03	12,57
CRYAA_MOUSE	Alpha-crystallin A chain	5	372,78	4,63E-03	656,75
CRYAB_MOUSE	Alpha-crystallin B chain	7	553,13	4,16E-03	239,74
CRBA1_MOUSE	Beta-crystallin A1	3	132,14	1,48E-04	Infinity
CRBA4_MOUSE	Beta-crystallin A4	2	81,85	2,57E-03	Infinity
CRBB1_MOUSE	Beta-crystallin B1	4	309,92	1,68E-03	1508,97
CRBB2_MOUSE	Beta-crystallin B2	9	542,15	5,36E-03	855,10
CRBB3_MOUSE	Beta-crystallin B3	5	261,96	2,52E-03	550,16
CRBS_MOUSE	Beta-crystallin S	7	310,73	3,97E-03	221,42
COTL1_MOUSE	Coactosin-like protein	2	116,25	1,71E-05	12,14
DEST_MOUSE	Destrin	3	120,46	3,40E-04	3,19
DPYL2_MOUSE	Dihydropyrimidinase-related protein 2	3	201,59	2,30E-03	58,60
DBNL_MOUSE	Drebrin-like protein	2	101,83	1,19E-03	11,51
IF4A1_MOUSE	Eukaryotic initiation factor 4A-I	2	118,21	3,28E-03	3,09
EZRI_MOUSE	Ezrin	2	84,25	3,81E-03	6,49
FABP5_MOUSE	Fatty acid-binding protein, epidermal	5	242,38	2,10E-03	194,26
ALDOC_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase C	3	210,02	7,12E-05	3,35
CRGB_MOUSE	Gamma-crystallin B	5	416,85	6,35E-04	Infinity
CRGC_MOUSE	Gamma-crystallin C	6	338,50	3,54E-03	259,01
CRGD_MOUSE	Gamma-crystallin D	3	168,76	4,99E-03	497,58
CRGE_MOUSE	Gamma-crystallin E	5	276,59	2,10E-03	312,63
GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase Mu 1	3	130,54	3,48E-03	2,35
GSTP1_MOUSE	Glutathione S-transferase P 1	6	259,52	5,10E-04	2,54
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	3	78,63	3,62E-04	6,22
HSPB1_MOUSE	Heat shock protein beta-1	8	338,64	1,26E-03	12,55
HNRPK_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2	90,92	3,80E-04	19,18
LDHA_MOUSE	L-lactate dehydrogenase A chain	2	150,06	1,46E-02	6,56
PRDX5_MOUSE	Peroxisredoxin-5, mitochondrial precursor	4	140,28	1,26E-04	3,60
PRDX6_MOUSE	Peroxisredoxin-6	2	116,89	3,63E-03	4,16
PGAM1_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 1	2	85,21	6,40E-04	4,15
GDIB_MOUSE	Rab GDP dissociation inhibitor beta	2	201,78	2,17E-04	2,42
STIP1_MOUSE	Stress-induced-phosphoprotein 1	2	71,17	4,16E-03	14,63
VAT1_MOUSE	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1	3	92,76	1,86E-03	2,77
TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain	2	161,81	2,29E-03	4,06
TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	6	330,50	1,02E-03	6,44
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain	6	310,83	8,79E-05	4,72

Supplemental Figure Legends.

Supplemental Figure 1.

Normal retinal morphology in *Lrp2^{Wnt1.cre-Ko}* and *Lrp2^{GFAP.cre-KO}* mutants. Nissl staining of retinal layers. Scale bars: 50 μ m in A, B.

Supplemental Figure 2.

MRI and histological analysis of control and *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant eyes. Parameters extracted from high resolution MRI images (A-C). Asphericity coefficient was calculated as an AL/ED ratio; circumference and area are increased in the mutants. Horizontal cryosections of control (D) and mutant (E) retinas showing retinal thinning and the presence of a posterior staphyloma in the mutant. Values are mean \pm SEM of 4 animals per age; ***p<0.01. Scale bars: 600 μ m in D, E.

Supplemental Figure 3.

Retinal development in control and *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant eyes. Retinal cryosections of control and mutant eyes between E13.5 and E19.5 show similar distribution of Otx2 (A), Pax6 (B) and Tuj-1 (C) in the developing retina. Scale bars: 25 μ m in A-C.

Supplemental Figure 4.

Cell proliferation and death in the developing retina of control and *Lrp2^{FoxG1.cre-KO}* mutant eyes. The cell proliferation PH3 immunostaining (green) is similarly distributed in the ventricular zone (vz) of control and mutant eyes at the ages indicated (A). TUNEL + cells (white arrows) are occasionally found in control and mutant retinas at the ages indicated (B). Scale bars: 25 μ m in A, B.

Supplemental Figure 5.

Retinal stretching and reduction of the number of axons in the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes. GFAP staining on retinal cryosections of control and mutant retinas at P10 (**A**) and P90 (**B**). The signal is increased in the astrocytes (arrows) of the mutants. Neurofilament Heavy Chain (NFH) staining is used to count the optic nerve axons at the ages indicated (**C**). Despite the reduction observed at P150 the diameter of the mutant optic nerve is not modified (**D**). Values are mean \pm SEM of 4 animals per age; ***p<0.01. Scale bars: 50 μ m in A; 30 μ m in B.

Supplemental Figure 6.

Scleral modifications in the the *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes. Reduced posterior sclera thickness (**A**) is associated with a reduction in the number of lamellae across the entire mutant sclera (**B**) at the ages indicated. TEM reveals collagen architecture in the inner, middle and outer layers of the posterior sclera in control (**C**, **D**, **E**, **I**) and mutant (**F**, **G**, **H**, **J**) eyes. Decreased interweaving, abnormal collagen packing of the mutant fibrils and fibril-free spaces are seen throughout the mutant retina. Values are mean \pm SEM of 3 animals per age; ***p<0.01. Scale bars: 1 μ m in C-H; 600 nm in I, J.

Supplemental Figure 7.

Biochemical analysis of the gel and liquid vitreous fractions in control and *Lrp2*^{FoxG1.cre-KO} mutant eyes. Western blot analysis of principal vitreous gel constituents (**A**) SDS-PAGE silver stain of control and mutant vitreous liquid (**B**) samples at P90. A control serum is shown for comparison in (**B**).

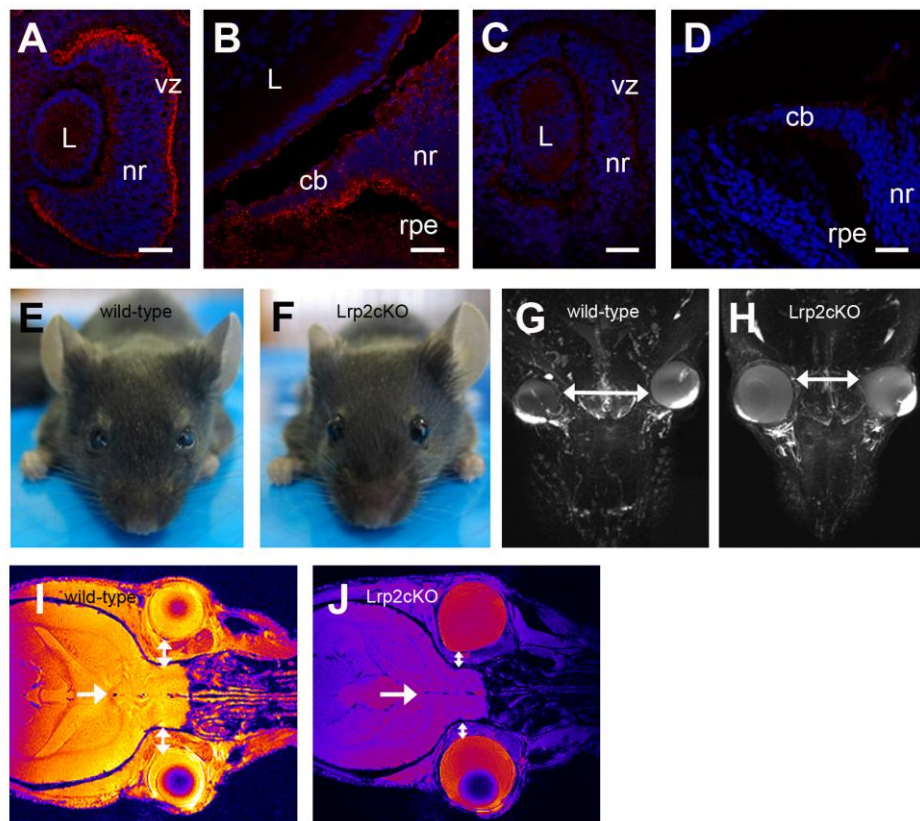


Figure 1

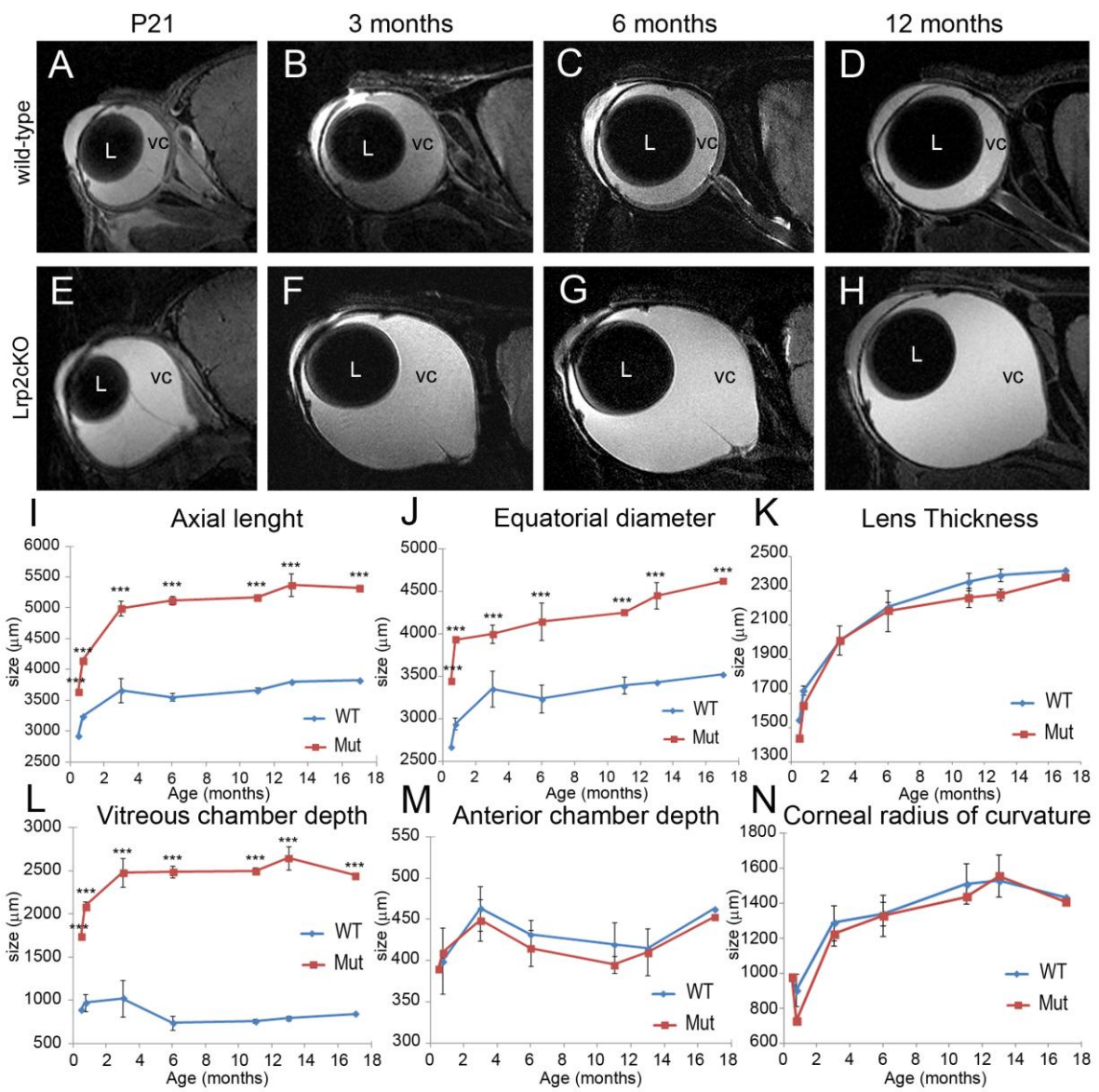


Figure 2

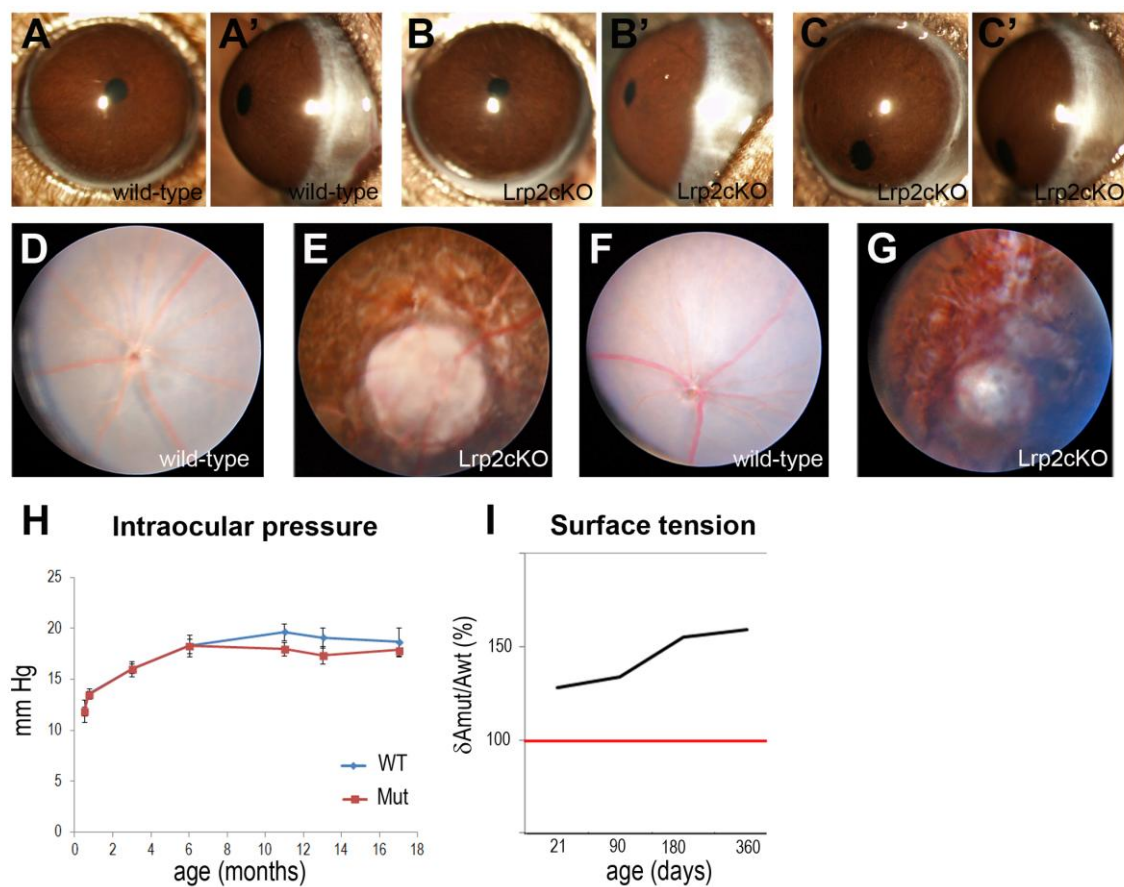


Figure 3

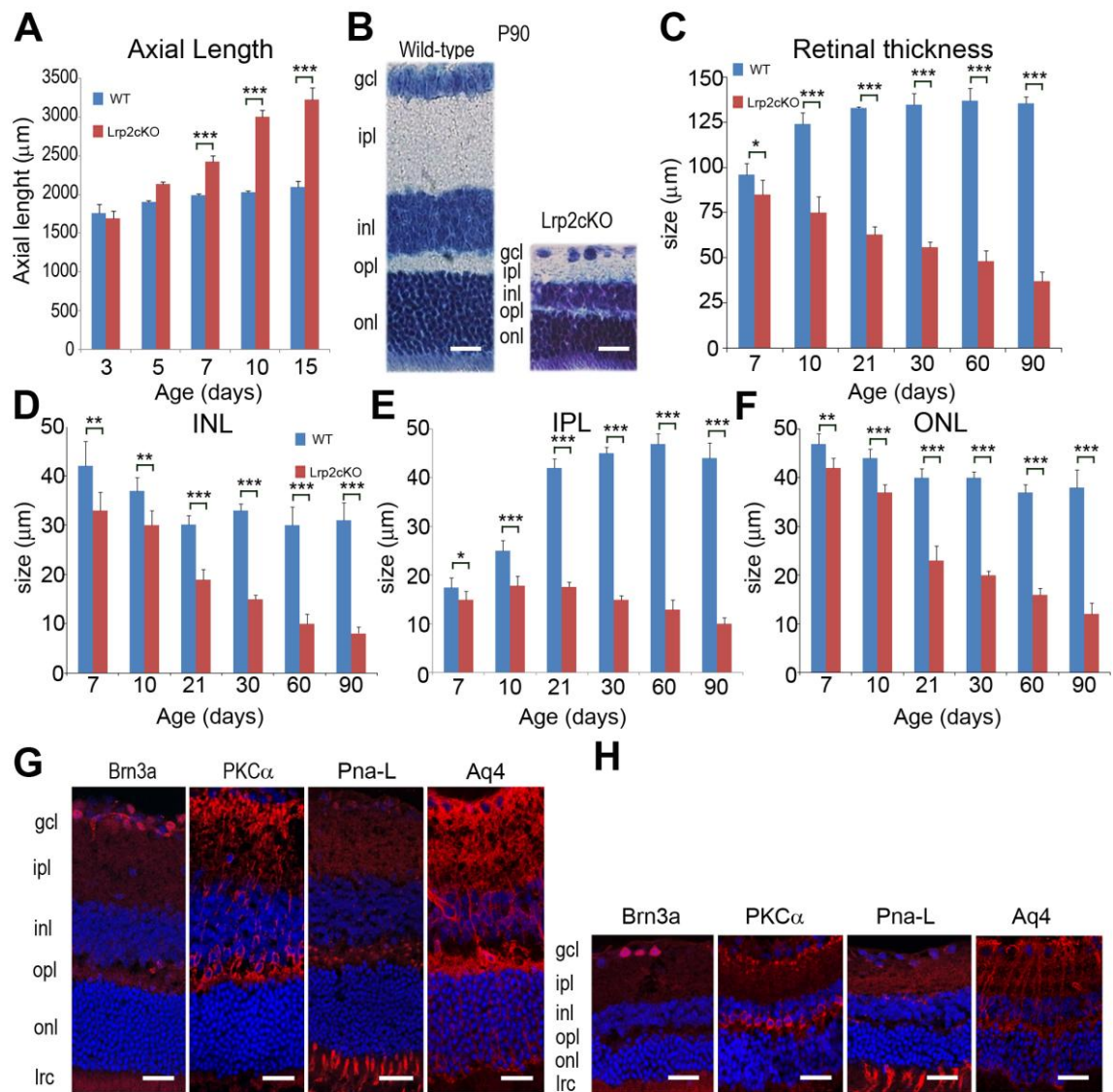


Figure 4

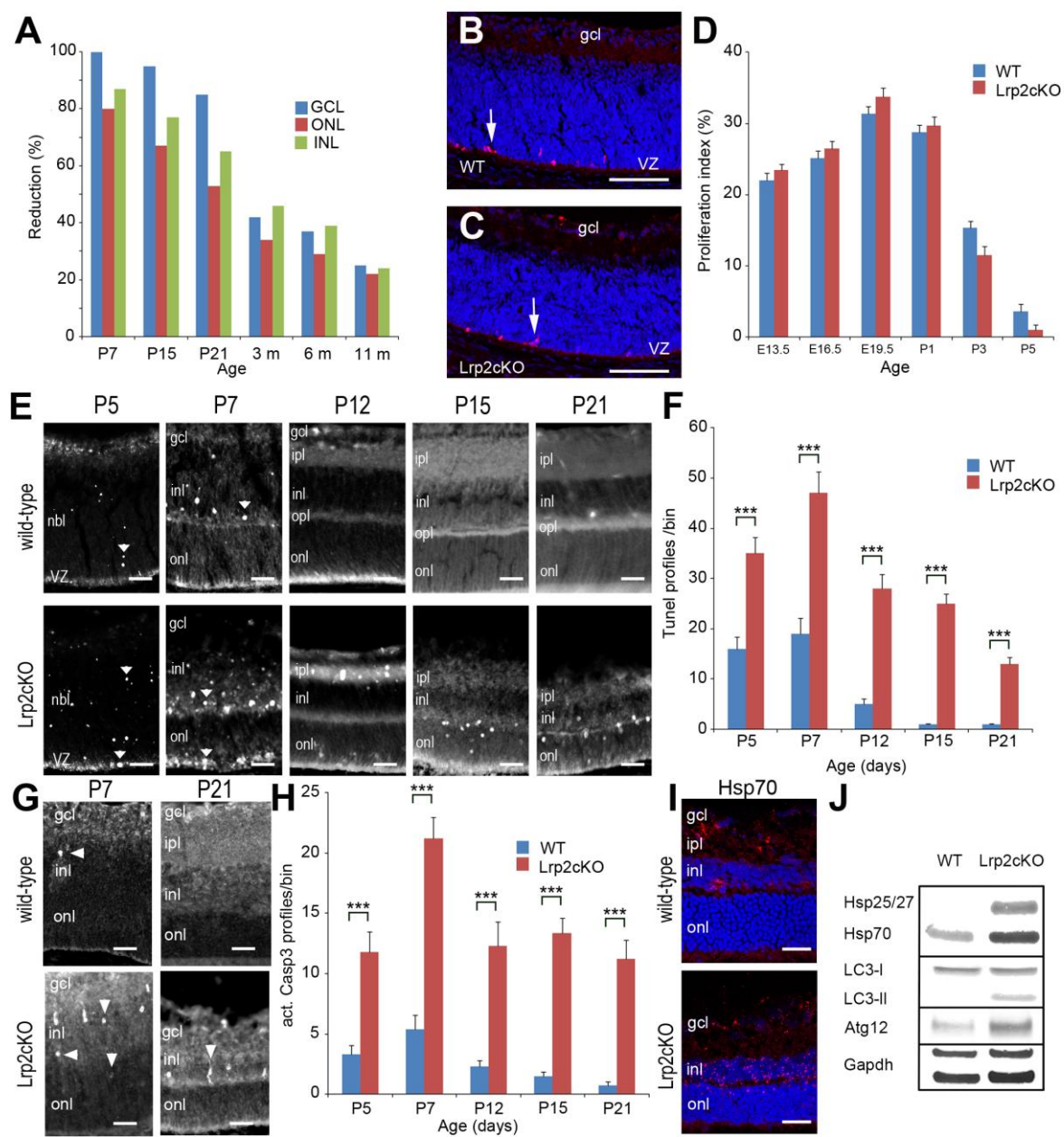


Figure 5

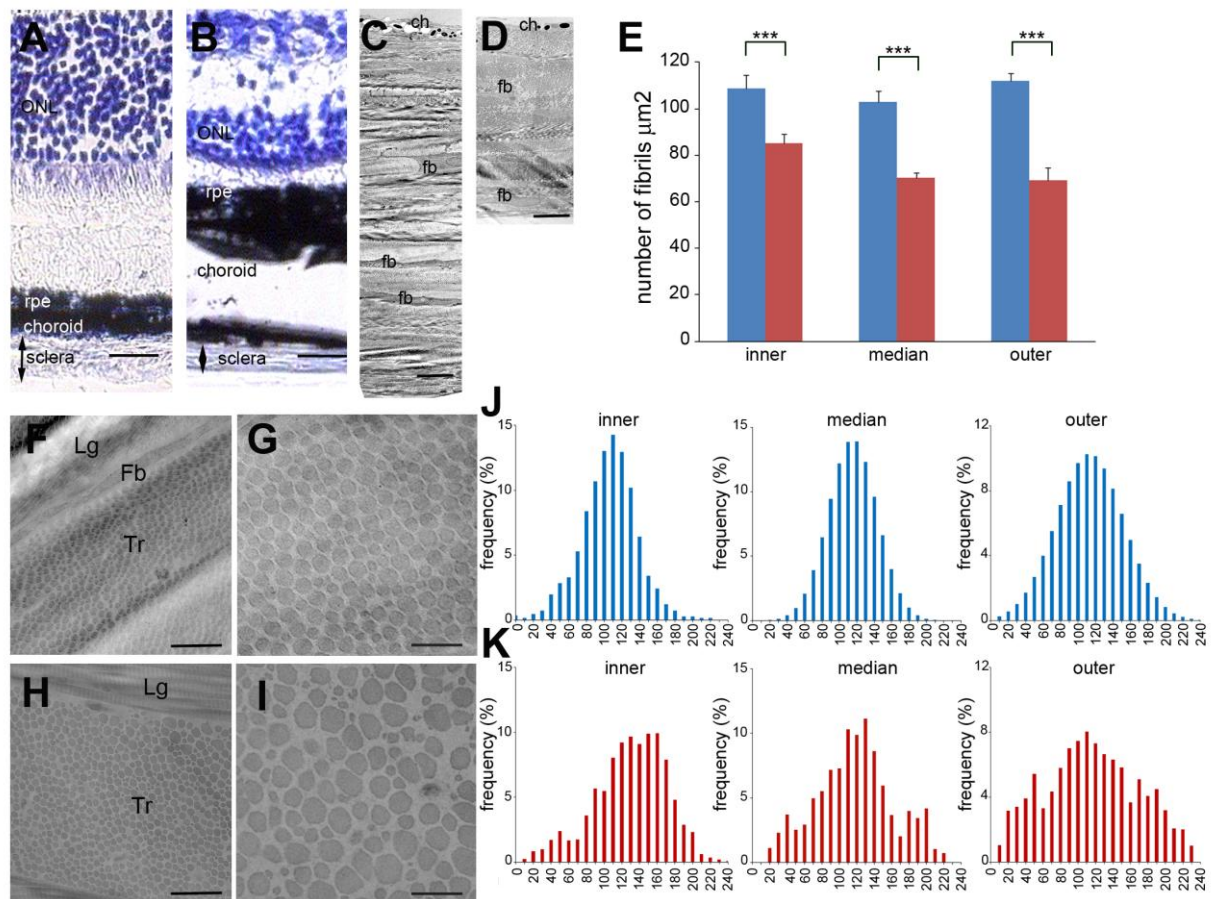


Figure 6

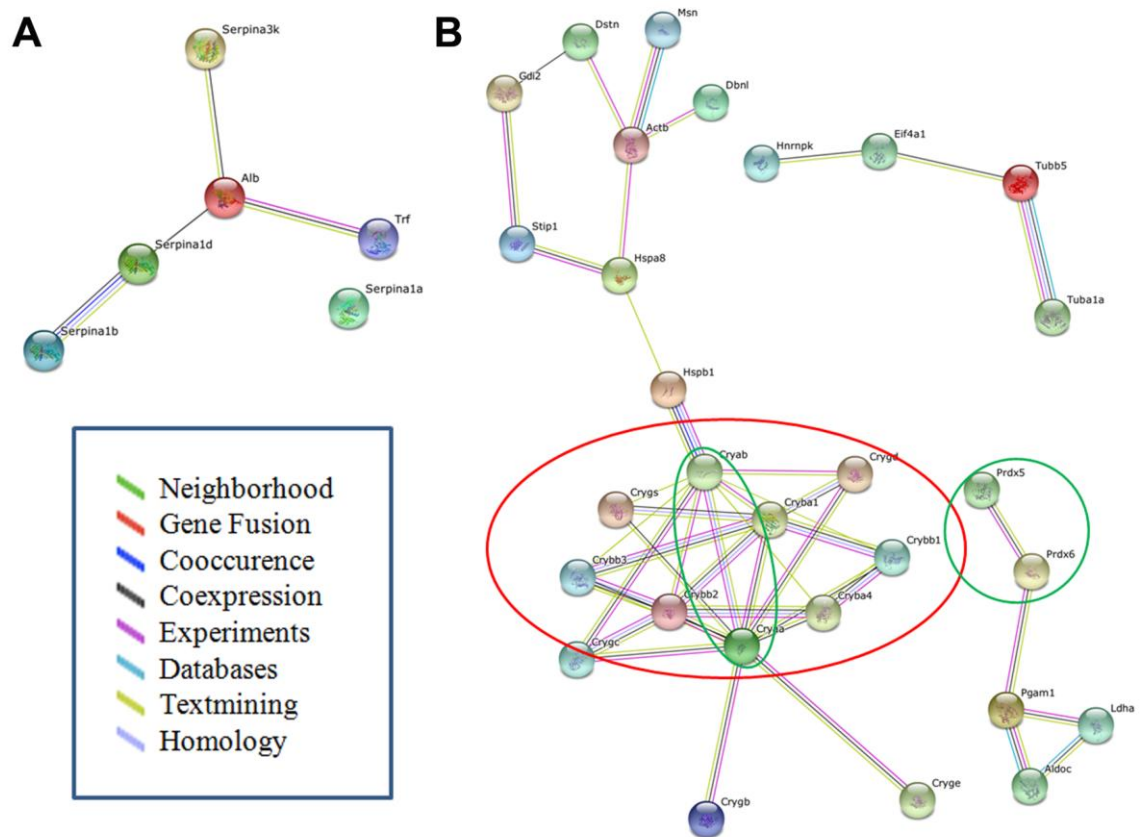
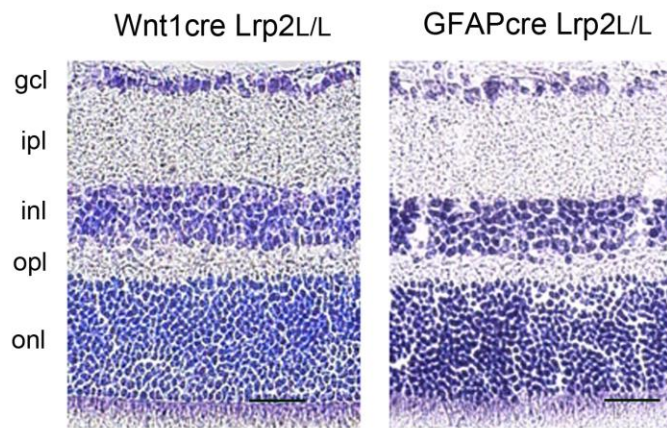
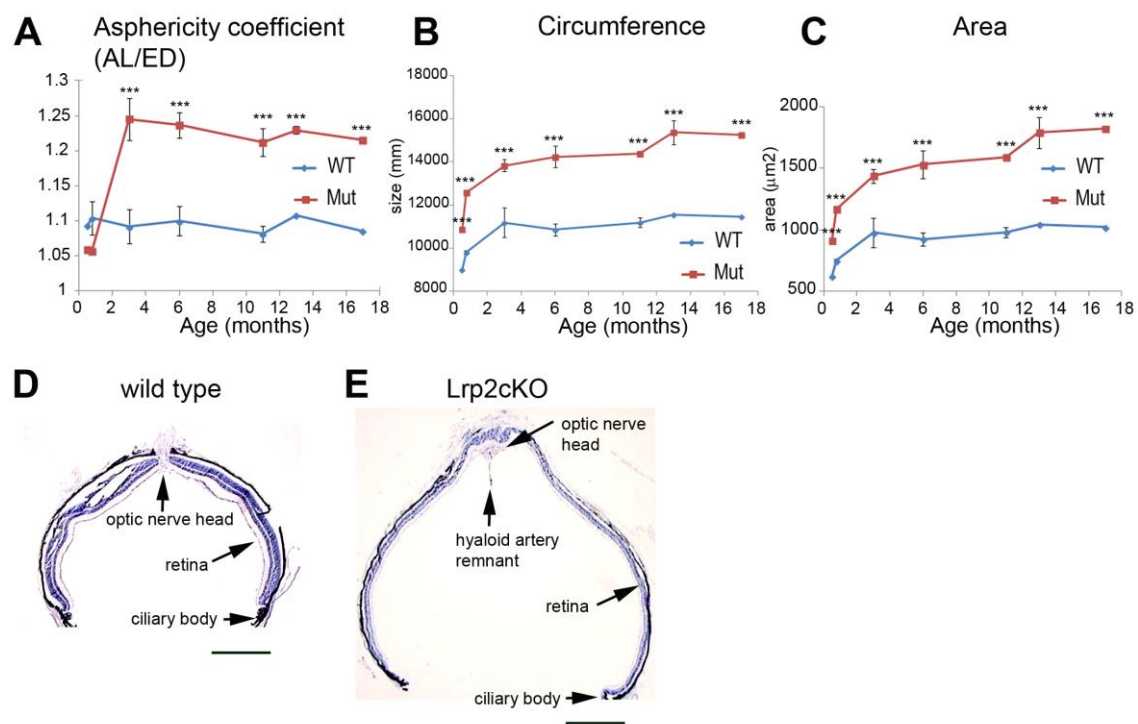
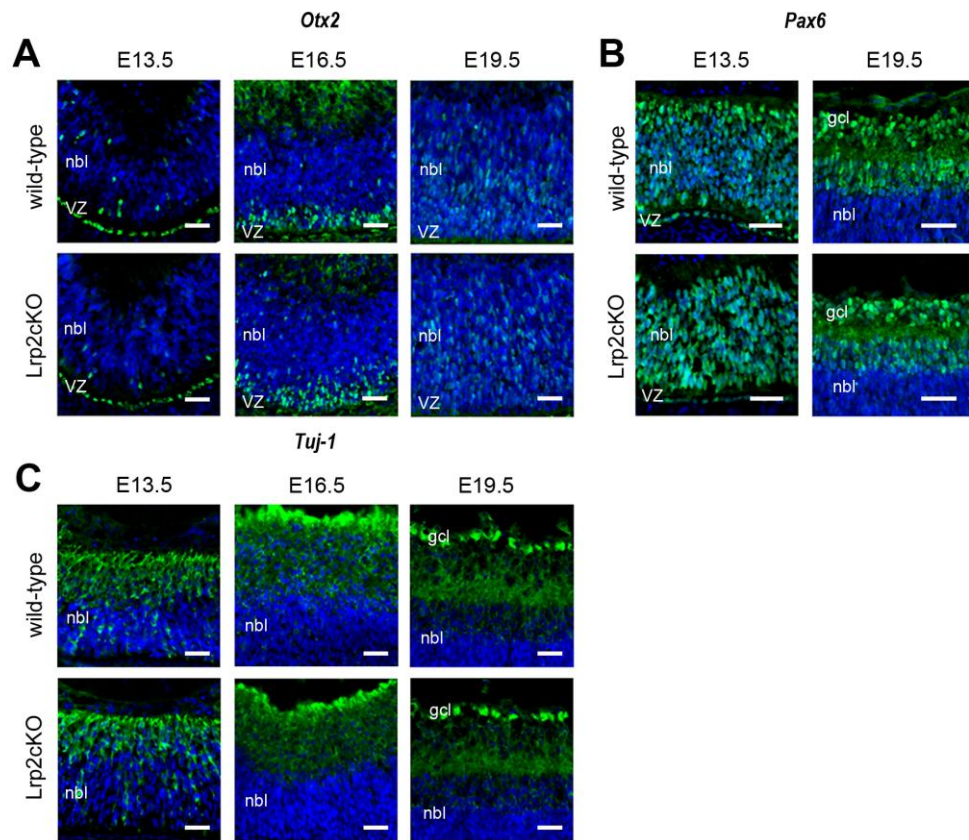
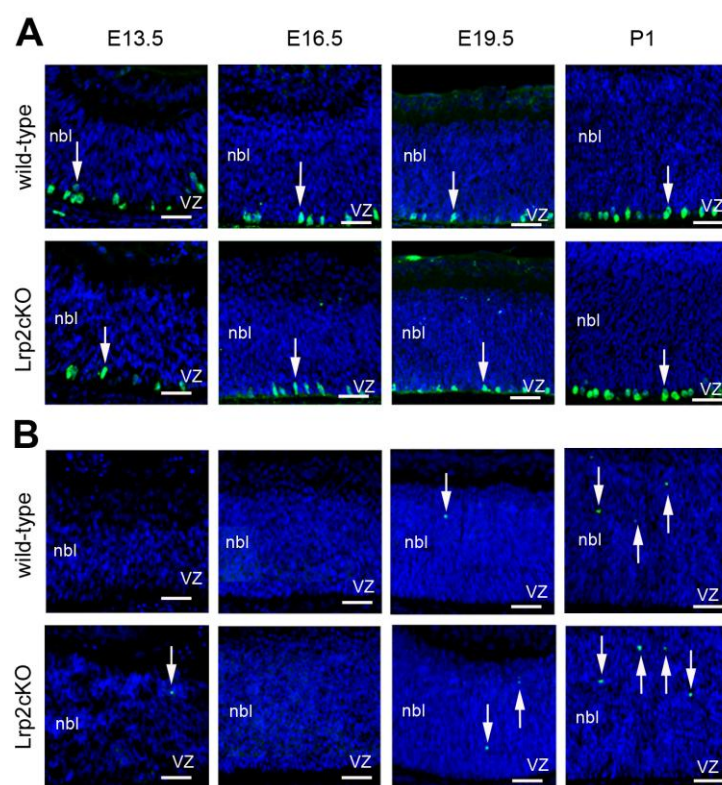


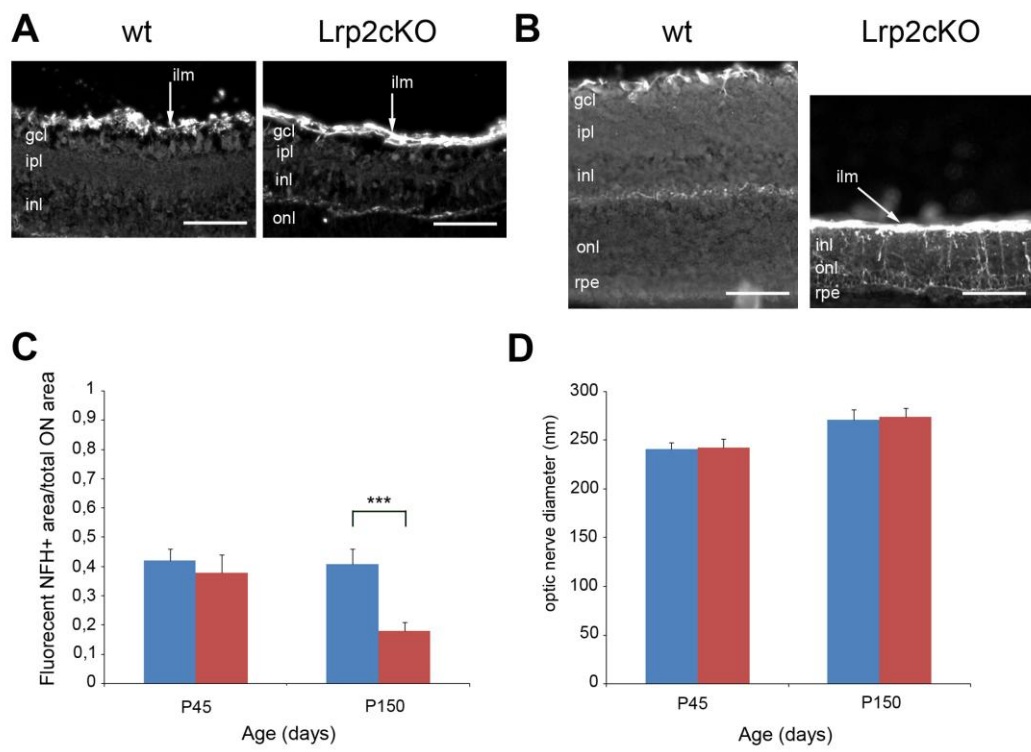
Figure 7

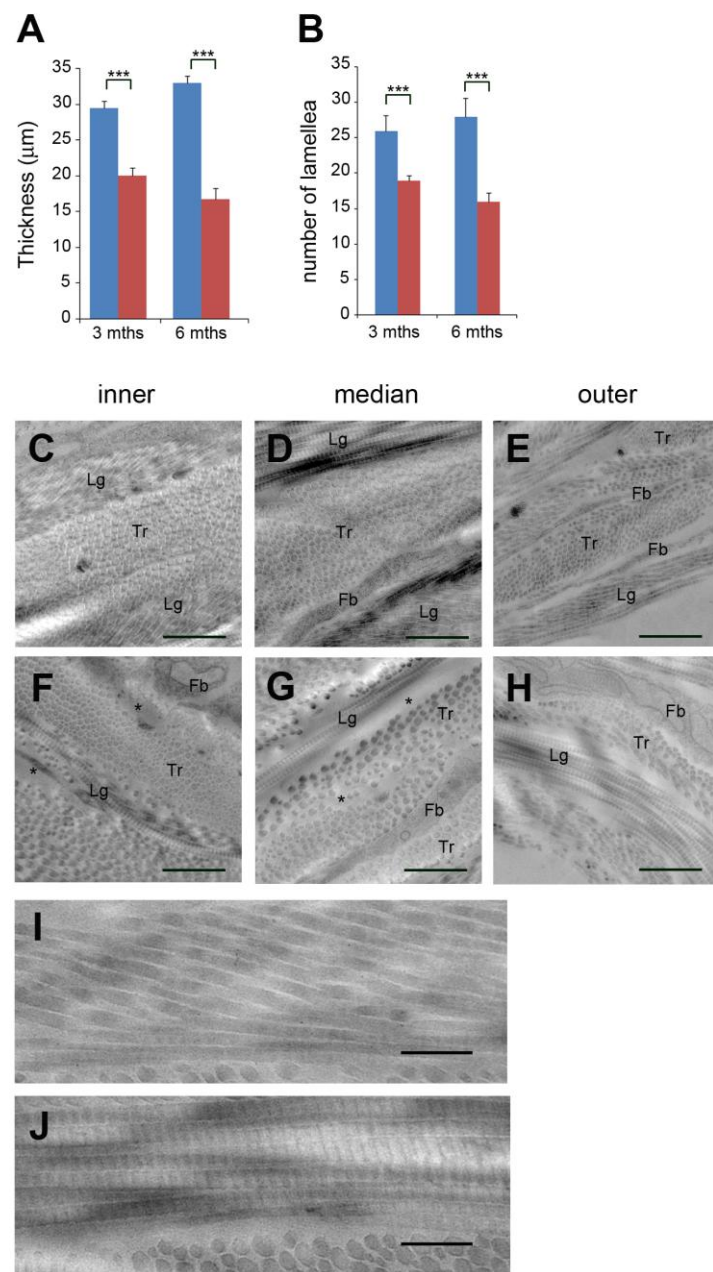






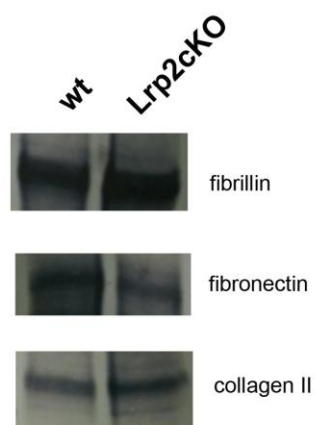




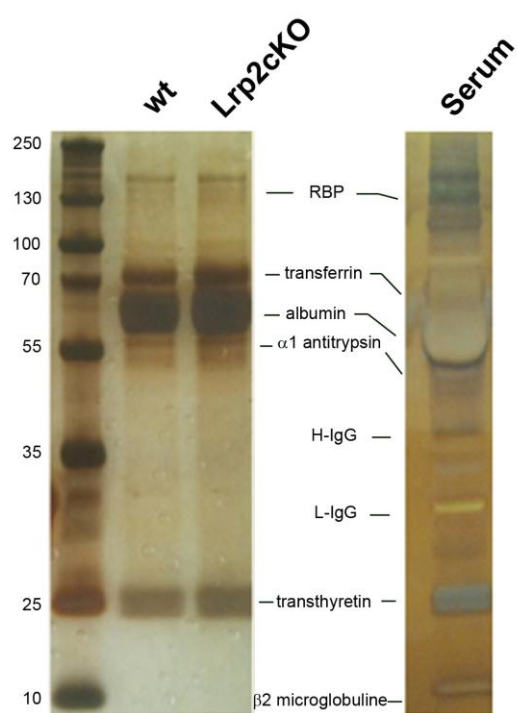


Supplemental 6

A vitreous gel



B liquid vitreous fraction



Notre étude révèle que la mégaline/Irp2, exprimée par le neuroépithélium antérieur est nécessaire pour la croissance normale de l'œil. L'inactivation dans les crêtes neurales, via *Wnt1-Cre*, ou dans les astrocytes du nerf optique et de la rétine, via *GFAP-Cre*, n'altère pas la morphogenèse de l'œil suggérant que le rôle de la Mégaline/Irp2 exprimée dans ces sites n'est pas important pour la croissance oculaire.

Les souris déficientes en mégaline/Irp2 *FoxG1-Cre Meg^{L/L}* développent des anomalies dégénératives dont la sévérité augmente au fil du temps. Elles présentent une augmentation de la longueur de l'œil, une augmentation de la profondeur de la chambre du vitré, un amincissement de la rétine et l'apparition d'un staphylome postérieur, ainsi que des modifications dans la structure de la sclère. Ces phénotypes sont retrouvés dans la myopie forte humaine.

Les éléments nouveaux apportés par la description de ce modèle *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*, sont les modifications de la sclère, la rétinopathie et surtout la modification majeure de la consistance et la composition du vitré. Cette première étude ne permet pas de mettre en évidence le mécanisme moléculaire de la myopie. Nous constatons néanmoins que l'élongation de la chambre du vitré et l'amincissement de la rétine sont les premiers symptômes. Ils sont suivis par les modifications de la sclère, suggérant que cette tunique ne serait pas la cible primaire. Les modifications du vitré suggèrent que dans ce modèle, cette structure soit essentielle pour la pathogenèse de la myopie.

En conclusion, l'inactivation de la mégaline/Irp2 reproduit très probablement la myopie forte observée chez les patients Donnai-Barrow. Les facteurs qui sont à l'origine des modifications dégénératives sont les éléments contenus dans le vitré. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à l'étude de la structure et la fonction de l'épithélium ciliaire, qui synthétise l'humeur aqueuse et en partie les composants de l'humeur vitrée.

2^{EME} PARTIE: RESULTATS

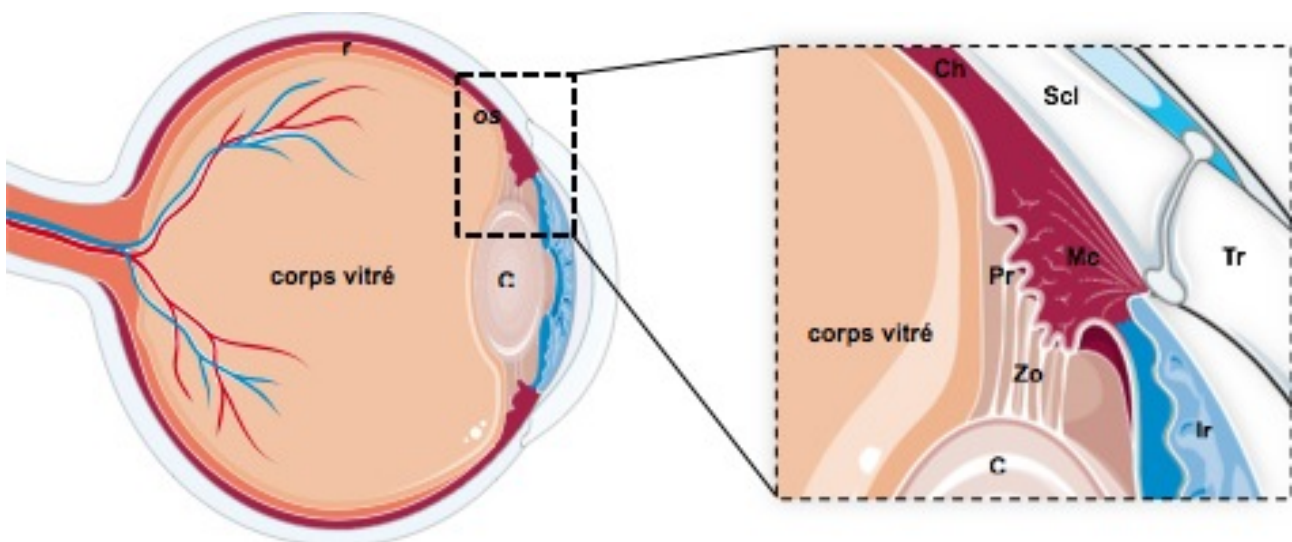


Figure 12 : Coupe sagittale de corps ciliaire humain.

Représentation schématique du corps ciliaire d'un oeil humain et du corps ciliaire:
 r (Rétine), os (*ora serrata*) C (Cristallin), Ch (Choroïde), Scl (Sclère), Tr (Réseau trabéculaire), Ir (Iris), Mc (Muscle ciliaire), Pr (Procès ciliaire), Zo (Fibres zonulaires). Adaptée de *Servier Medical Art*.

I-Le corps Ciliaire

La structure et la fonction du corps ciliaire de l'homme sont similaires à celles de la souris (Napier & Kidson, 2005). Le corps ciliaire est une structure complexe qui remplit plusieurs rôles essentiels pour la maintenance de la vision, il permet l'accommodation de l'oeil (Gilmartin & Hogan, 1985) et la sécrétion des composants de l'humeur aqueuse et celle du vitré (Barsotti et al., 1992). Le corps ciliaire est un compartiment structurellement bien ordonné (Figure 12).

I-1-Organisation structurale et cellulaire du corps ciliaire

Organisation centro-périphérique :

Le corps ciliaire s'étend, selon un axe centro-périphérique, sur une zone restreinte allant des racines de l'iris jusqu'à l'*ora serrata* (Figure 12, os), une ligne dentelée formant la frontière entre la partie optique et la partie aveugle de la rétine (Figure 12, r).

Organisation antéro-postérieur :

Le corps ciliaire comprend l'anneau ciliaire (*pars plana*) et la couronne ciliaire (*pars plicata*). Cette dernière contient environ 70 procès ciliaires, qui en vue postérieure couronnent l'équateur du cristallin. Sur une coupe sagittale, la couronne, présente un profil triangulaire derrière la racine de l'iris (Figure 12, lr). Le corps ciliaire est bien vascularisé avec la présence de grands capillaires à endothélium fenêtré dans chacun des procès ciliaires (Smith & Raviola, 1983).

Le corps ciliaire est composé d'un muscle ciliaire (Figure 12, Mc). Il permet l'accommodation de l'œil et l'évacuation de l'humeur aqueuse à travers le réseau trabéculaire, en action coordonné avec les fibres zonulaires (Napier & Kidson, 2005). Ce dernier se compose de faisceaux de myosites lisses orientés selon les directions méridionales (*muscle de Brücke*), radiaire et circulaire (*muscle de Müller*) (Napier & Kidson, 2005). Le muscle ciliaire prend son origine sur l'éperon scléral principalement. Ses faisceaux méridionaux se terminent dans le complexe basal et le stroma fibreux de la

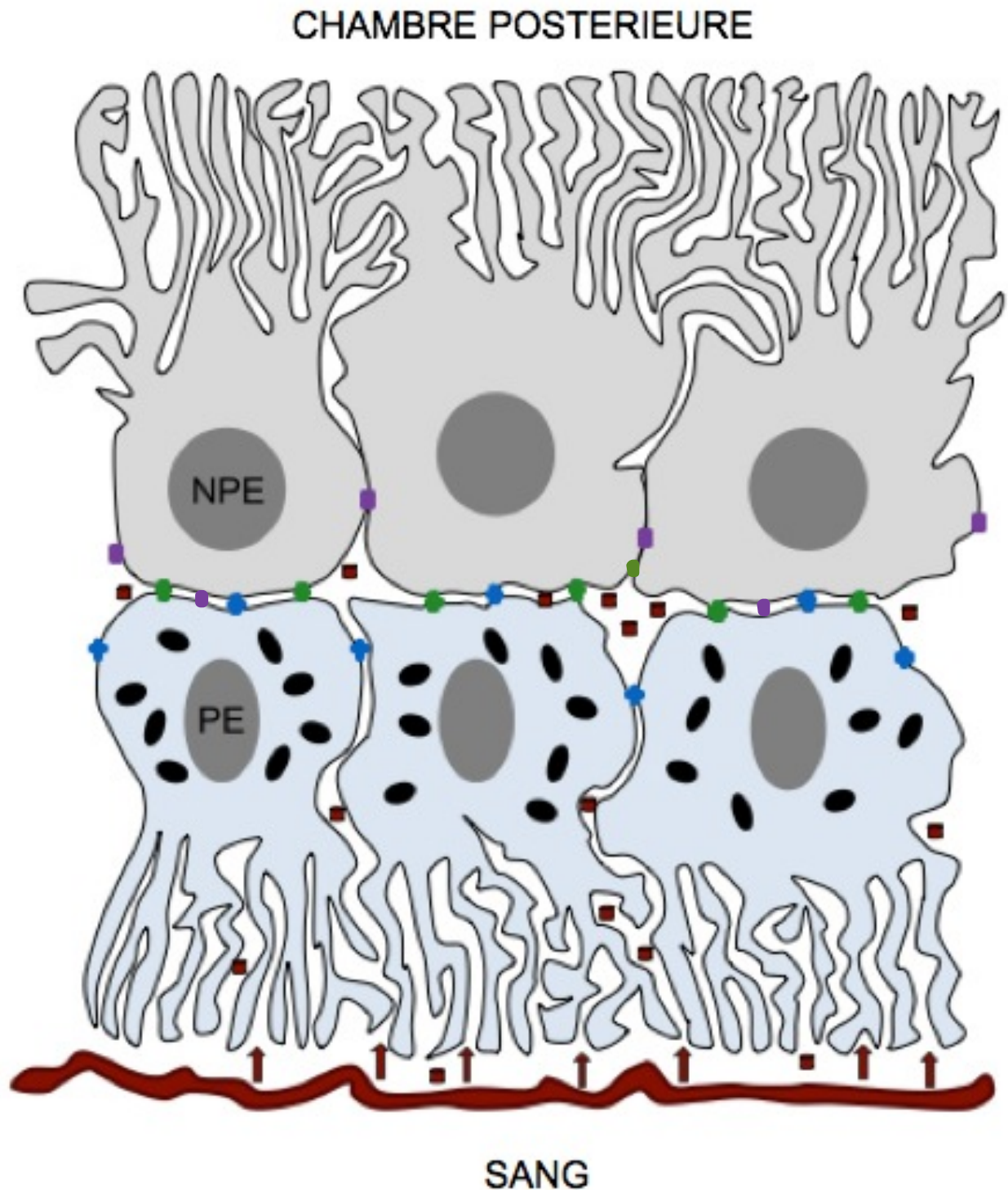


Figure 13 : Structure de l'épithélium ciliaire.

Représentation schématique sagittale de l'épithélium du corps ciliaire d'un oeil humain:
 NPE (Epithélium non pigmenté), PE (Epithélium pigmenté)
 ■ (Jonction serrée), ● (Jonction adhérente), ◆ (Jonction communicante), ● (mélanosome),
 ■ (molécule sanguine).

choroïde et sur la face interne de la sclérotique. Il est innervé par le système nerveux parasympathique (Napier & Kidson, 2005) (Figure 12).

Reposant sur cette partie musculaire, les procès ciliaires occupent la plus grande partie du corps ciliaire (Figure 12, Pr). Ils synthétisent l'humeur aqueuse, des glycoprotéines du corps vitré, des enzymes antioxydantes, et des neuropeptides (Coca-Prados et al., 1999; Bishop et al., 2002). Des études de microscopie électronique ont montré que chez de nombreuses espèces comme le porc (Kessel & Kardon, 1979), le poulet (Bard & Ross, 1982), et l'humain (Ritch et al., 1996) ces structures forment un arrangement de replis régulier autour de l'œil. Chaque procès est composé d'un capillaire cerné par un ample stroma recouvert par une double couche d'épithélium, provenant de deux anciens feuillets de la cupule optique (Raviola and Raviola, 1978) (Figure 13). La couche externe, qui contient des mélanosomes porte le nom d'épithélium pigmenté (Figure 13, PE), et la couche interne quant à elle se nomme l'épithélium non pigmenté (Figure 13, NPE), c'est ce dernier qui sécrète l'humeur aqueuse. Ils se font face à leur pôle apical respectif (Raviola and Raviola, 1978). Ils servent de barrière hémato-aqueuse, empêchant le passage passif de protéines plasmatiques jusqu'à la chambre postérieure de l'œil. Des études de l'ultrastructure de l'épithélium ciliaire, réalisées chez le lapin et le primate ont révélé que la fonctionnalité de cette barrière était due à un réseau complexe de jonctions intercellulaires (Raviola, 1971; Raviola & Raviola 1978) (Figure 13). Les deux faces de l'épithélium possèdent une lame basale. Celle de l'épithélium non pigmenté sert de lieu d'ancrage pour les fibres zonulaires aussi bien à hauteur de l'anneau que de la couronne. Ces fibres zonulaires (Figure 12, Zo) sont ancrées à la lame basale de l'épithélium non pigmenté, elles font le lien entre celui-ci et le cristallin. Elles se composent de microfibrilles de fibrilline et elles sont probablement produites par l'épithélium non pigmenté de l'anneau. Elles forment des faisceaux se dirigeant vers l'équateur du cristallin et s'amarrent à sa capsule (Figure 12, C).

I-2-Fonction du corps ciliaire

Le corps ciliaire a trois principales fonctions ; 1/ de permettre l'accommodation (Gilmartin & Hogan, 1985), 2/ d'établir une barrière hémato-aqueuse fonctionnelle (Freddo, 2013), et 3/ de synthétiser l'humeur aqueuse et vitrée (Bishop et al., 2002).

I-2-1-L'accommodation

La vision de près exige un travail musculaire ; en revanche, la vision à distance ne consomme pas d'énergie musculaire. Dans l'œil au repos (regardant au loin), les fibres zonulaires sont tendues et le cristallin est aplati. Ce sont les forces de traction passive de la sclérotique et du complexe basale de la choroïde qui agissent sur le corps ciliaire et qui tendent les fibres zonulaires par l'intermédiaire de l'épithélium ciliaire (Streeten & Licari, 1983). La vision de près est rendue possible par le travail du muscle ciliaire qui s'oppose à la traction passive. En contractant ses faisceaux méridionaux et radiaires, il attire le corps ciliaire vers l'avant et en contractant ses fibres circulaires, il le rapproche de l'équateur du cristallin. Les fibres zonulaires se détendent, ce qui augmente la courbure est donc la convergence du cristallin (Streeten & Licari, 1983). Les forces de rétraction passive prennent le dessus et le cristallin s'aplatit. L'accommodation se contrôle de manière réflexe.

I-2-2-La barrière hémato-aqueuse

La barrière hémato-aqueuse est formée par les jonctions serrées situées entre les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire (Raviola and Raviola, 1978) (Figure 13). La présence de ces jonctions empêche la diffusion passive des éléments du stroma vers la chambre postérieure de l'œil. C'est majoritairement l'épithélium non pigmenté qui est actif lors de ce flux ionique (McLaughlin et al., 1998). Les ions passent à travers les jonctions communicantes (Raviola and Raviola, 1978). Les cellules pigmentées de l'épithélium ciliaire sont associées entre elles par des jonctions adhérentes, communicantes et des desmosomes. Les deux couches communiquent par les jonctions communicantes et sont liées par des jonctions adhérentes (*puncta adherens*, PA) (Raviola, 1974) (Figure 13 et 14).

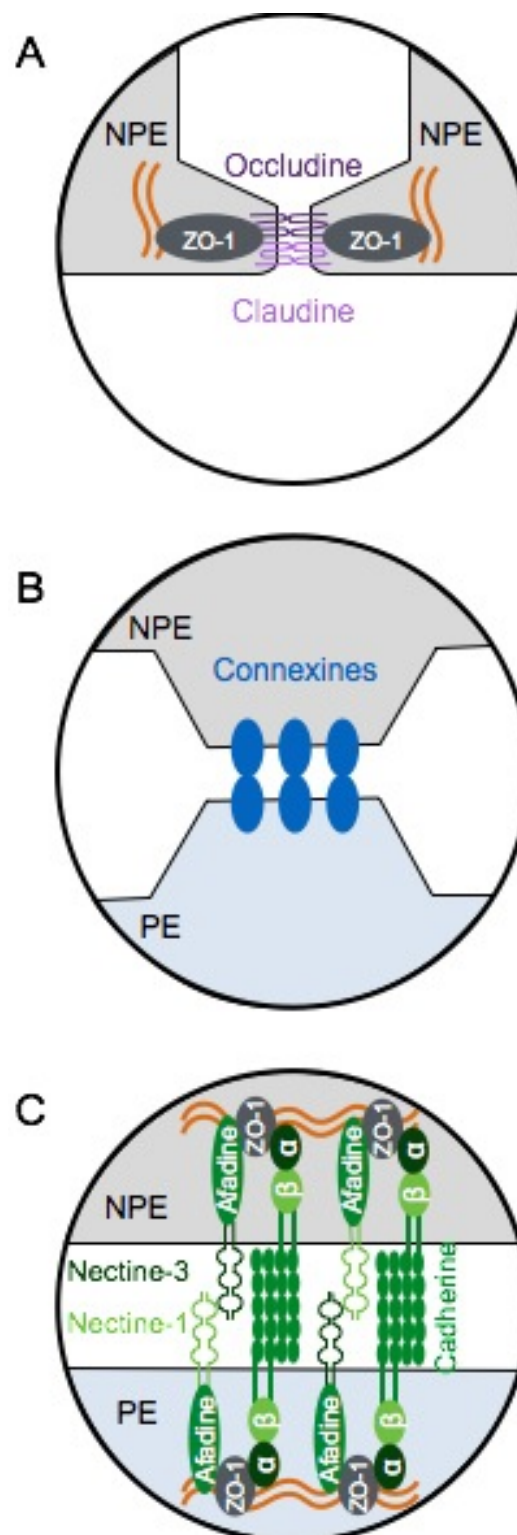


Figure 14 : Différentes jonctions cellulaires dans l'épithélium ciliaire.

Représentation schématique des jonctions cellulaires de l'épithélium ciliaire d'un oeil humain. (A) Jonction serrée, (B) Jonction communicante, (C) Jonction adhérentes. NPE (Epithélium non pigmenté), PE (Epithélium pigmenté), α (α -caténine), β (β -caténine), (microfilament d'actine).

i-Les jonctions serrées

Dans les tissus épithéliaux, les jonctions serrées bloquent la circulation des fluides entre les cellules et assurent ainsi l'étanchéité entre ces dernières (Niessen, 2007). Elles peuvent laisser diffuser certains peptides hydrophiles de petites tailles (<15 nm) (Kirschner et al., 2010). Les jonctions serrées sont localisées à l'apex des cellules épithéliales où elles forment une bande continue tout autour, qui assure l'étanchéité (Kirschner et al., 2010). Elles sont composées de protéines spécifiques, les claudines et les occludines, qui sont des protéines transmembranaires. Leurs domaines extracellulaires relient les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes (Furuse et al., 2002) (Figure 14, A). Leur domaine cytoplasmique interagit avec des protéines cytosoliques dont la protéine ZO-1 qui les connectent aux filaments d'actine (Fanning et al., 1998) (Figure 14, A).

ii-Les jonctions communicantes

Ce sont des jonctions intercellulaires mettant en relation le cytoplasme de deux cellules voisines. La jonction communicante est un assemblage de quelques dizaines à quelques milliers de canaux qui traversent les deux membranes cellulaires, en formant des plaques jonctionnelles. Chaque canal est formé de deux connexons, un par membrane cellulaire (Coffey et al., 2002) (Figure 14, B), aboutissant à la formation d'un canal hydrophile de 2 nm de diamètre. Dans l'épithélium ciliaire, elles sont essentiellement constituées de la connexine 43 (Shin et al., 1996).

iii-Les jonctions adhérentes

Ceinturant aussi la cellule à son pôle apical, elles laissent un espace intercellulaire plus important que les jonctions serrées (Niessen, 2007). Elles sont composées de deux familles de molécules d'adhésion; les cadhérines et les nectines (Takai et al., 2003a; Takai and Nakanishi, 2003) (Figure 14, C). Ces jonctions sont aussi composées au niveau intracellulaire de caténines et d'afadine (Inagaki et al., 2005). La première permet de faire la liaison entre les microfilaments d'actine et les cadhérines, tandis que la deuxième le fait entre les microfilaments d'actines et les nectines (Inagaki et al., 2005) (Figure 14, C).

Des jonctions qui ressemblent aux jonctions adhérentes, les *puncta adherens (PA)* ont été observées au niveau de l'interface entre les cellules non pigmentées et pigmentées de l'épithélium ciliaire (Raviola 1974). formées (Raviola 1974).

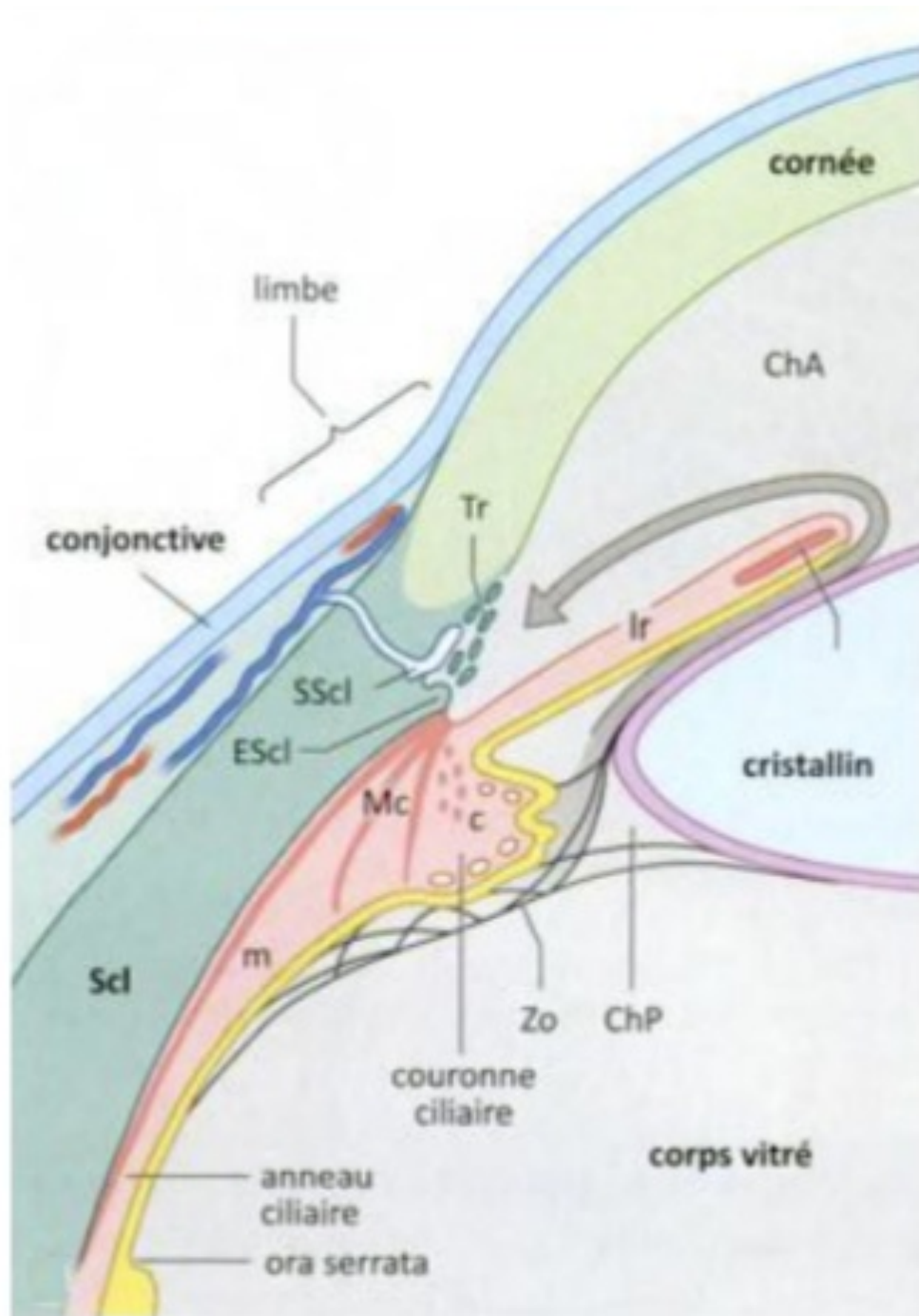


Figure 15 : L'angle iridocornéen et les structures associées.

Représentation de l'angle iridocornéen humain et des structures associées. Tr (Réseau trabéculaire), SScI (Canal de Schlemm), EScl (Eperon du canal de Schlemm), Scl (Sclère) rn (rétine neurale), c (procès ciliaire), Mc (Muscle ciliaire), Ir (Iris), ChA (Chambre antérieure), ChP (Chambre postérieure), Zo (Zonule ciliaire). La flèche grise indique le trajet de l'humeur aqueuse de la chambre postérieure à la chambre antérieure. *Repris de Histologie de Lullmann-Rauch, 2006.*

I-2-3-La synthèse de l'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse remplissant la chambre antérieure est sécrétée de manière constitutive, coule entre les fibres zonulaires et rejoint la chambre antérieure en passant par la pupille, entre l'iris et le cristallin (Raviola, 1971). Tous les composants ioniques de l'humeur aqueuse proviennent de la voie sanguine (Civan and Macknight, 2004). Par exemple, le Na^+ et le Cl^- passent du stroma ciliaire dans l'épithélium pigmenté (McLaughlin et al., 1998), puis dans l'épithélium non pigmenté via les jonctions communicantes (Civan and Macknight, 2004). Tandis que le Na^+ est pompé dans la chambre postérieure de l'œil par une ATPase (Avila et al., 2002), le Cl^- , quant à lui, quitte cette chambre via un canal à chlorures (Civan and Macknight, 2004). L'eau suit la pression osmotique (Walker et al., 1999; Yamaguchi et al., 2006). Le drainage de l'humeur aqueuse est effectué par l'angle iridocornéen (Figure 15). Elle quitte la chambre antérieure (Figure 15, ChA) et rejoint le sinus veineux de la sclère (Figure 15, Scl) (Gray et al., 2009). L'humeur aqueuse assure la nutrition du cristallin et de la cornée. En effet, il a été montré que l'épithélium non pigmenté synthétise et sécrète de nombreuses protéines nutritives, comme l'albumine ou la transthyrétine (Barsotti et al., 1992).

L'angle iridocornéen chez la souris est formé d'une part par l'iris (Figure 15, Ir) et d'autre part par la cornée et un petit segment de la sclérotique (Gray et al., 2009). C'est ce segment réduit qui héberge le sinus veineux de la sclère, ou « canal de Schlemm » (Figure 15, SScl), une sorte de drain circulaire derrière lequel la sclérotique émet un renforcement, l'éperon scléral (Figure 15, EScl) (Smith et al., 2001). Ce dernier sert d'origine au muscle ciliaire (Figure 15, Mc) qui se dirige vers l'arrière. On trouve devant l'éperon le réseau trabéculaire iridoscléral (Figure 15, Tr), un système lâche de travées conjonctives recouvertes d'un épithélium prolongeant l'épithélium postérieur de la cornée. Les espaces entre les trabécules servent au passage de l'humeur aqueuse vers le sinus veineux scléral. Ce dernier communique avec les veines épisclérales par des petits canaux traversant la sclérotique (Smith et al., 2001). Environ 15 % de l'humeur aqueuse diffusent directement de l'angle iridocornéen dans les espaces extracellulaires de l'uvée et de la sclérotique et de là dans les veines vorticineuses (voie de drainage uvéoscléral) (Gray et al., 2009). Sa structure est conservée chez l'homme.

La fonction de l'épithélium ciliaire dans la synthèse des humeurs aqueuse et vitrée a été bien étudiée. Par contre sa fonction endocytaire est moins connue, notamment au pôle apicale des cellules non pigmentées du l'épithélium ciliaire.

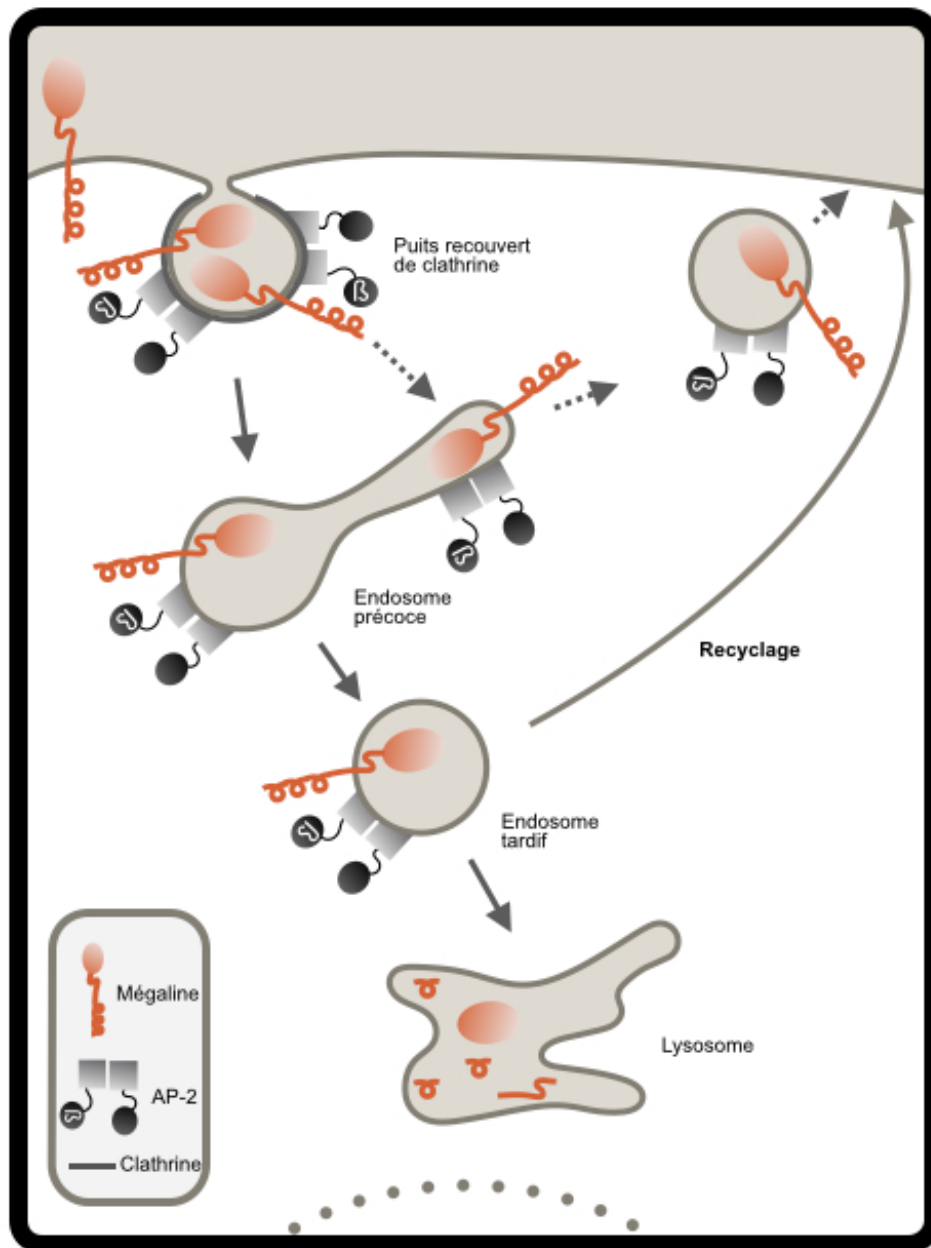


Figure 16 : La mégaline/lrp2 dans l'endocytose.

Schéma représentant le rôle de la mégaline dans l'endocytose.
Adapté de Shah et al., 2013.

II- Endocytose

Il existe trois grand type d'endocytoses (Mayor & Pagano, 2007 : la phagocytose qui concerne les molécules de moins de 300 nm, la pinocytose, concernant les petites molécules en phase fluide en passant par des puits de clathrine, et l'endocytose dépendante de récepteurs membranaire, qui permet la sélection fine des composants à internaliser (Mayor & Pagano, 2007) (Figure 16). L'endocytose par récepteur est clathrine-dépendante, cavéoline-dépendante ou clathrine/cavéoline indépendante (Mayor & Pagano, 2007) (Figure 16). L'endocytose permet une interaction de la cellule avec son environnement extérieur. Ce mécanisme contrôle tout un vaste ensemble d'activités biologiques cellulaires. Par exemple on retrouve l'endocytose dans l'internalisation d'éléments nutritifs essentiels, dans la signalisation intracellulaire mais aussi dans la réponse immunologique. L'endocytose est donc un processus clef intervenant dès le développement embryonnaire.

Dans le cas de la famille des LDLRs et de la mégaline/lrp2 l'endocytose se fait de manière clathrine-dépendant (Figure 16). La mégaline/lrp2 comme tous les membres de la famille des récepteurs au LDLRs permettent l'endocytose de leur ligand (Christensen et al., 2012; Czekay et al., 1997). Ce mécanisme de transport permet à une molécule de pénétrer dans la cellule via l'invagination de la membrane plasmique de celle-ci, entraînant le détachement d'une vésicule.

II-1-Endocytose clathrine-dépendante

C'est le mécanisme d'endocytose le plus connu (Figure 16). La clathrine forme une couche protéique qui tapisse la surface cytoplasmique de la vésicule endocytique (Forgac et al., 1983). C'est au niveau de cette couche que le complexe ligand/récepteur est internalisé. Ces vésicules perdent rapidement leur couche de clathrine et le complexe ligand/récepteur est transporté vers un endosome précoce (Tan et al., 1993) (Figure 16). La dissociation du ligand envers son récepteur s'effectue dans ces compartiments. Ceci est rendu possible grâce à un pH légèrement acide qui est maintenu par la pompe ATP-dépendante (Czekay et al 1993). D'un coté les récepteurs enfin libres, s'accumulent dans des vésicules de recyclage qui les transporteront à nouveau vers les membranes plasmiques (Majeed et al 2014), mais ils peuvent aussi suivre une voie de dégradation (Molfetta et al., 2014). D'un autre coté, les endosomes précoces, contenant les ligands

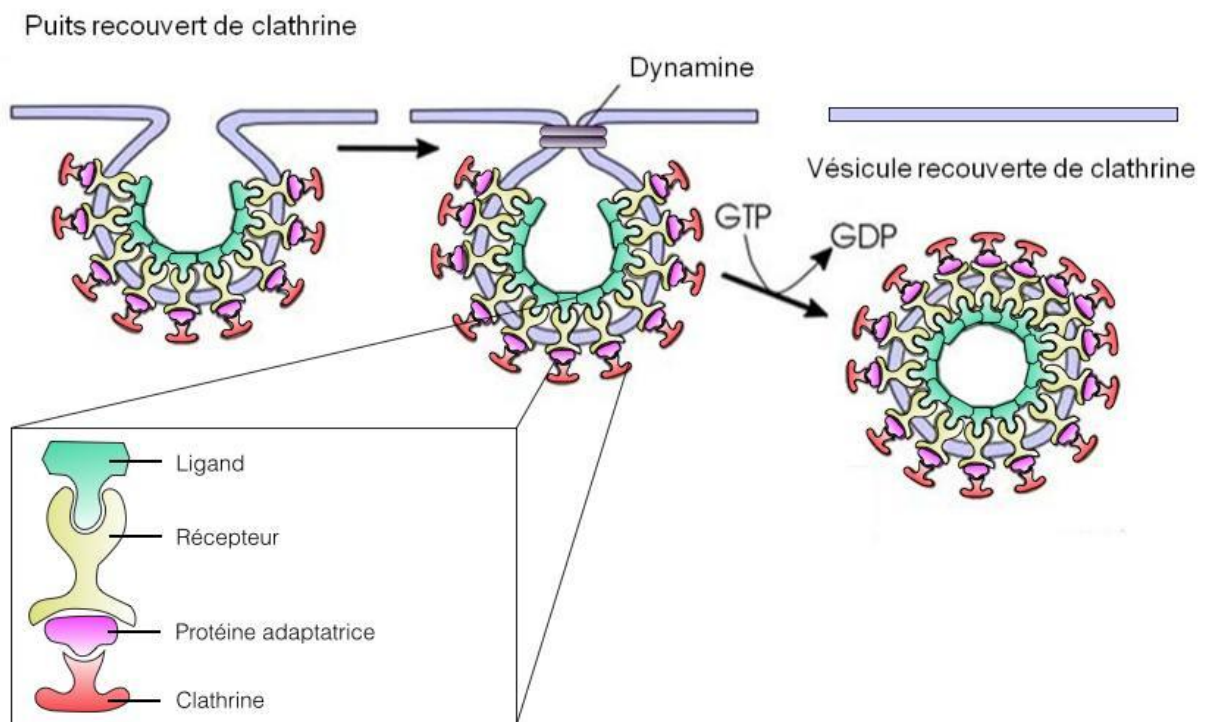


Figure 17 : Formation des vésicules recouvertes de clathrine.

Schéma représentant les trois grandes étapes de la formation des vésicules recouvertes de clathrine.

Adapté de O'Day.

libres, vont fusionner avec des endosomes tardifs qui à leur tour vont fusionner avec des lysosomes (Kornilova, 2014). C'est dans ce dernier compartiment que les ligands (protéines) vont être dégradés. Cette dégradation est due au pH acide et aussi à la forte concentration en enzymes lysosomales contenues dans ces compartiments (Kornilova, 2014).

D'un côté, l'endocytose permet de capter les nutriments essentiels à la cellule (Jensen et al., 2014; Laatsch et al., 2012; Ye et al., 2012), d'un autre côté la fonction de l'endocytose sera l'activation de voies de signalisation (Ockenga et al., 2014; Tomas et al., 2014). Certains récepteurs des LDL sont capables simultanément des deux fonctions (Nakayama et al., 2013).

II-1-1- Protéines impliquées dans la formation des puits et des vésicules recouverts de clathrine

La formation des puits de clathrine nécessite l'intervention de plusieurs partenaires. On en dénombre trois grands types: tout d'abord, la clathrine (Kibbey et al., 1998). Puis des adaptateurs capables à la fois de lier la clathrine et les différents récepteurs, comme l'adaptateur l'Adaptator Protein-2 (AP-2) (He et al., 2002). Enfin, d'autres protéines accessoires pouvant se lier spécifiquement à certains récepteurs, et ainsi moduler le processus de l'endocytose ou les voies de signalisation (Mulkeans & Cooper, 2012; Park et al., 2014) (Figure 17).

i- La clathrine

Cette protéine est constituée de trois chaînes lourdes de 190 kDa chacune fortement associées à une chaîne légère de 30 kDa (Huang et al., 1997). Ce complexe forme une structure appelée: triskelion (Jin & Nossal, 1993). Ils s'assemblent entre eux, induisant une courbure à la membrane plasmique, qui est à l'origine de la formation de la vésicule (Lin et al., 1991).

ii- L'adaptateur AP-2

Il existe deux adaptateurs impliqués dans la formation des puits de clathrine, AP-1 et AP-2 (Gallusser & Kirchhausen, 1993). Le premier est impliqué dans la formation des puits au niveau du réseau trans-golgien (Liu et al., 2008). Tandis que son homologue AP-2, est impliqué dans la formation des puits directement au niveau de la membrane

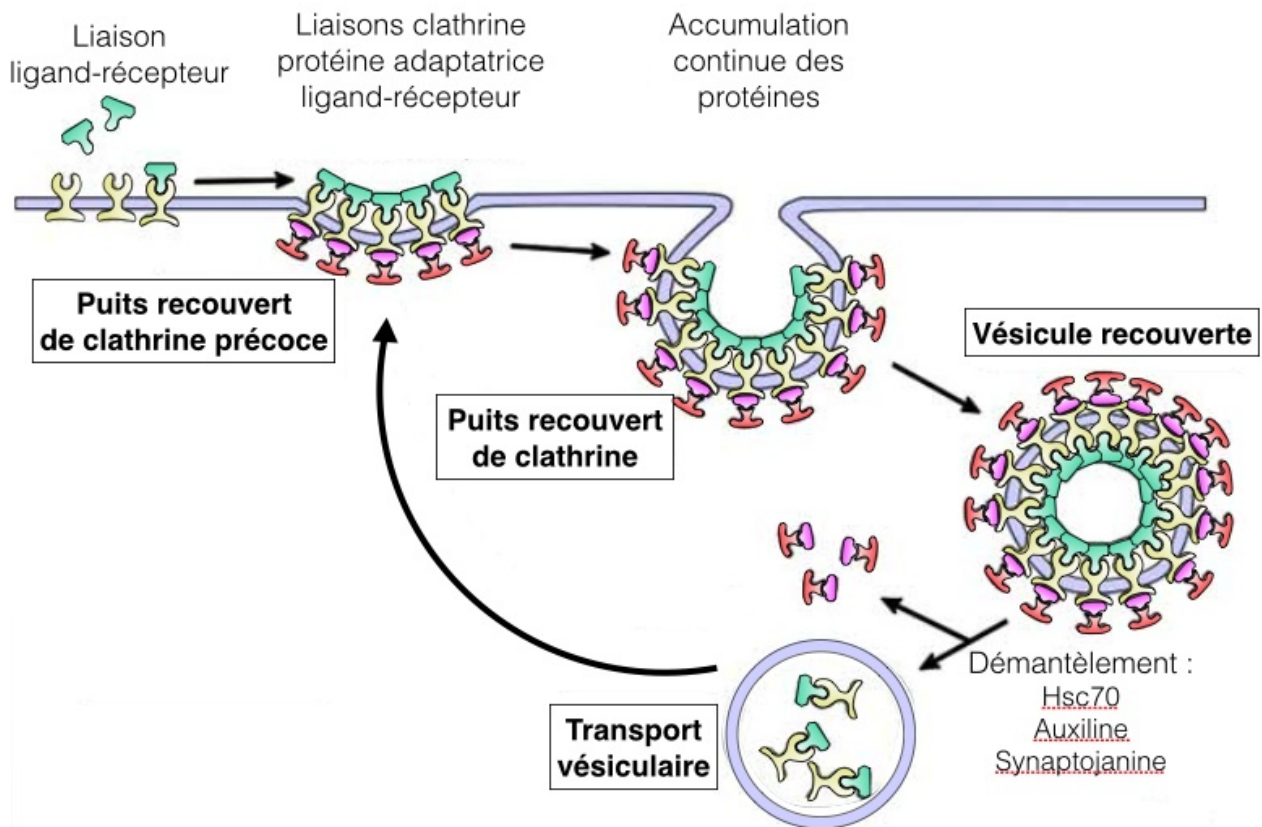


Figure 18 : Démantèlement des vésicules recouvertes de clathrine.

Schéma représentant les protéines impliquées dans le démantèlement des vésicules recouvertes de clathrine.

Adapté de O'Day.

plasmique (Beck et al., 1992). Les deux sont des hétéro-tétramères constitués premièrement de deux polypeptides, les adaptines, puis d'une chaîne moyenne et d'une petite chaîne β (Heldwein et al., 2004). Des études effectuées sur l'expression de AP-2 ont montré que son inhibition via une ligation de Small Interfering RNA (siRNA) entraînait une diminution significative du nombre de puits à clathrine (Hinrichsen et al., 2003; Motley et al., 2003). Cependant ces mêmes études ont montré que AP-2 n'était pas nécessaire à l'endocytose des LDLRs, suggérant ainsi l'existence d'autres protéines adaptatrices (Traub., 2003). De même, il a été montré que les LDLRs pouvaient se lier directement à la clathrine (Kibbey et al., 1998).

iii- Les autres protéines adaptatrices et protéines accessoires

On appelle protéine adaptatrice toute protéine capable de lier à la fois la queue cytoplasmique du récepteur et de l'autre côté la clathrine. Ces protéines interviennent à plusieurs niveaux de l'endocytose. Que ce soit au niveau du recrutement des récepteurs (AP-2, Eps15, Dab2) (Suzuki et al 2012 Mishra et al., 2002), ou au niveau de la scission des vésicules (dynamine, amphiphysine) (Van der Bliek et al., 1993; Slepnev et al., 2000; Huser et al., 2013) (Figure 17) ou même la désagrégation du manteau de clathrine (auxiline) (Ahle & Ungewickell; 1990; Krantz et al., 2013) (Figure 18).

Lorsque la vésicule se détache de la membrane et pénètre plus en profondeur dans la cellule, elle subit un démantèlement de son manteau. Lors de cet événement AP-2 et la clathrine se détachent de la membrane de la vésicule et sont recyclées à la membrane plasmique de la cellule, pour reformer un puits à clathrine (Beck et al., 1992). Ce processus est régulé par plusieurs protéines, qui ont pour rôle de permettre un juste équilibre entre la quantité de la protéine AP-2 et celle de la clathrine contenues dans les membranes vésiculaires et la quantité nécessaire à la réalisation de nouveaux puits à clathrine (He et al., 2002). Ainsi l'auxiline qui via sa liaison à la clathrine, va permettre un recrutement et une activation directement dans les puits de la protéine Hsc70 (Figure 18) (Krantz et al., 2013)). Hsc70 est une ATPase qui catalyse la réaction qui va permettre de relâcher la clathrine des vésicules (Morgan et al., 2001; Ungewickell et al., 1995). La synaptojanine, joue également un rôle dans le démantèlement de la clathrine et AP-2 des vésicules. En effet des études réalisées sur des souris invalidées pour le gène de la synaptojanine montrent une augmentation significative du nombre de vésicules dans le cytoplasme des cellules (Cremona et al., 1999) (Figure 18).

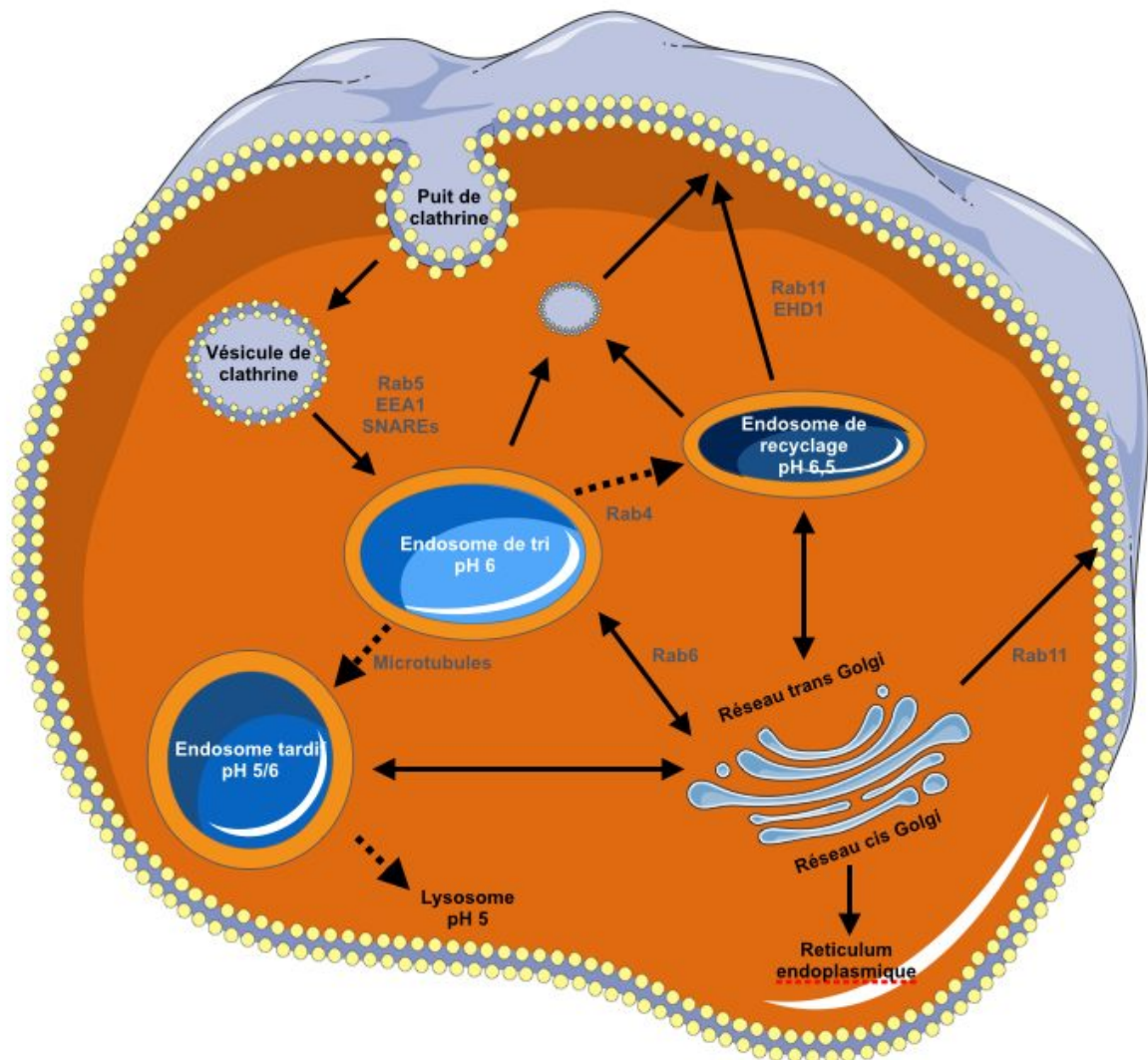


Figure 19 : Régulation du trafic endocytaire.

Schéma représentant les protéines impliquées dans la fusion des vésicules endocytiques, dans le transport des molécules aux divers endosomes et dans celui des endosomes de recyclage.

Adapté de Owen et al., 2004

II-1-2- La régulation du trafic vésiculaire

En simplifiant, l'endocytose est un trafic de protéines à travers une succession de compartiments dynamiques, chacun se distinguant les uns des autres. Ces différences se font au niveau de leur localisation dans la cellule mais aussi de leur pH et enfin des protéines qui leurs sont associées. La régulation de ce trafic fait intervenir un ensemble de protéine (Figure 19) (Lukacs et al., 1997; Owen et al., 2004) . Les plus importantes, les protéines Rab appartiennent à une famille de plus de 60 petites GTPases régulatrices. Tous les membres de cette famille joue un rôle majeur dans la régulation des différentes étapes du transport membranaire dans le système endosomal (Bucci et al., 2014). En effet ces protéines participent à la formation des vésicules de transport, ainsi que leur mobilités et leur diverses fusions dans la voie endocytaire (Zerial & McBride, 2001; Bucci et al., 2014). La forme activée, Rab-GTP, est capable de lier des effecteurs contribuant à leur localisation dans les endosomes de la voie endocytaire (Zerial & McBride, 2001). Toutes les Rabs ne participent pas à la formation des vésicules de transport, ainsi que leur mobilité et leur diverses fusions dans la voie endocytaire. Certaines ont un rôle dans la sécrétion des vésicules (Pfeffer, 2003). Ainsi alors que Rab5 semble réguler la fusion des vésicules recouverts de clathrine avec les endosomes de tri (McLauchlan et al., 1998), Rab6 semble quant à lui avoir un rôle dans le transport des endosome au réseau trans-golgien (TGN) (Sun et al., 2007). Enfin Rab11, assure le recyclage des molécules et jouerait donc un rôle dans la voie de sécrétion (Lapierre et al., 2012) (Figure 19).

Enfin d'autres protéines similaires aux Rabs participent aussi à la machinerie de la voie d'endocytose. Ainsi, l'Early Endosome Antigen 1 (EEA1) et les SNAP receptors (SNAREs), semblent réguler la fusion des vésicules recouvertes de clathrine avec les endosomes de tri (Mills et al., 1998; Geumann et al., 2008; Ohya et al., 2009). Les microtubules sont nécessaires pour le transport des molécules de l'endosome de tri vers les endosomes tardifs (Kornilova, 2014). Enfin Eps15-Homology Domain Protein 1 (EHD1) joue un rôle dans le recyclage des molécules et il serait aussi un acteur de la voie de la sécrétion (Rainey et al., 2010) (Figure 19).

Il est important de noter que c'est le changement de pH qui reflète, et donc permet de différencier, l'état de maturation entre les différents endosomes, qu'ils soient de tri, tardifs, de recyclage ou encore des lysosomes (Owen et al., 2004).

RESULTATS

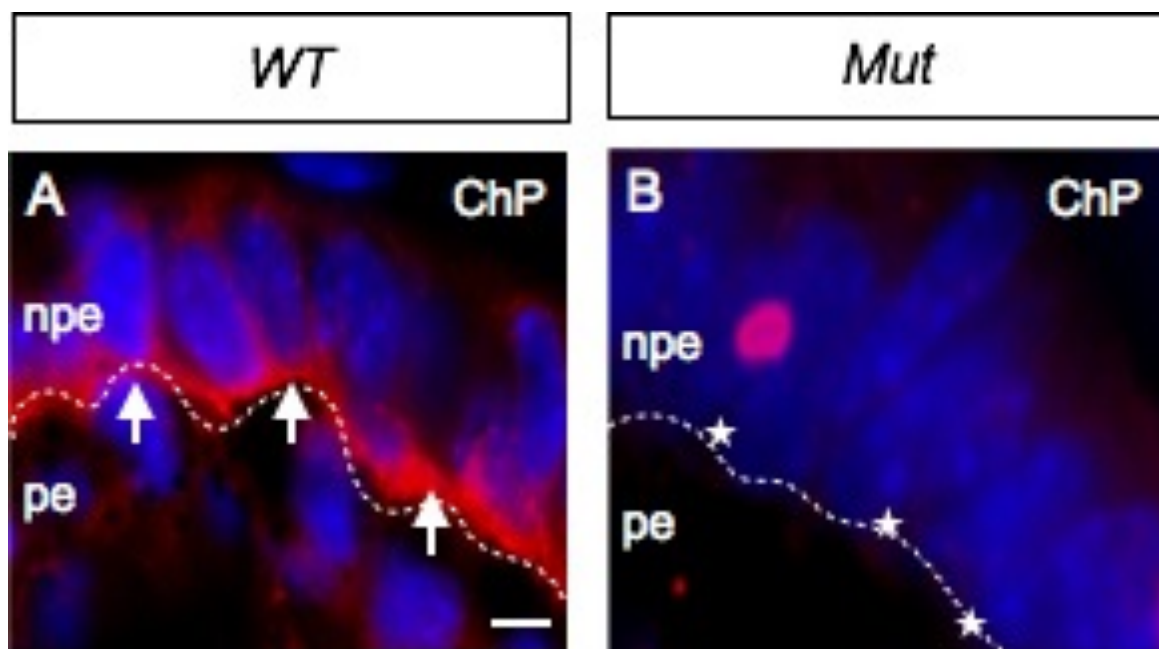


Figure 1 : Expression de la mégaline/lrp2 dans l'épithélium du corps ciliaire.

(A,B) coupe sagittale de corps ciliaire de souris contrôle adulte (A) et de souris mutante adulte (B). marquage de la mégaline. npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté), ChP (chambre postérieure). Les flèches indiquent le marquage mégaline, les étoiles indiquent son absence. La ligne blanche indique l'interface entre l'épithélium pigmenté et le non pigmenté. 5 souris par lignée. Echelle = 1 μ m.

L'expression de la mégaline est détectée au pôle apical des cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire (A, flèches). Chez les souris mutantes, une perte complète du signal est observée (B, astérisques).

I-Analyse structurelle et fonctionnelle de la mégaline/lrp2 dans l'épithélium du corps ciliaire

Nous avons émis l'hypothèse que la mégaline/Lrp2 exprimée par le corps ciliaire était nécessaire pour sa fonction endocytaire.

I-1-Fonction de la mégaline/lrp2 sur la clairance des protéines plasmatiques

La mégaline/lrp2 est fortement exprimée dans l'épithélium ciliaire au niveau du pôle apical des cellules de l'épithélium non pigmenté, chez les souris contrôles (Figure 1 A). Chez les souris mutantes nous ne détectons plus le marquage mégaline/lrp2 au niveau de l'épithélium non pigmenté (Figure 1 B).

Pour étudier la fonction de la mégaline/lrp2 exprimée par le corps ciliaire, nous avons eu recours à des injections, dans le sinus retro-orbital d'albumine fluorescente chez des souris contrôles et mutantes, pour ainsi suivre son internalisation. Les souris sont ensuite sacrifiées 5 et 15 minutes après l'injection (Figure 2 A,B et I,J).

A 5 minutes après l'injection, nous pouvons observer que chez les souris contrôles l'albumine arrive, au niveau du corps ciliaire, par les capillaires (Figure 2 A, cap). Nous retrouvons par la suite l'albumine entre les cellules de l'épithélium pigmenté du corps ciliaire et à l'interface entre ces mêmes cellules et celles de l'épithélium non pigmenté (Figure 2 A). Nous ne détectons pas d'albumine entre les cellules de l'épithélium non pigmenté (Figure 2 A, npe).

A 15 minutes après l'injection, nous détectons la protéine fluorescente surtout dans des vésicules cytosoliques au niveau des cellules de l'épithélium non pigmenté (Figure 2 B, npe), et moins à l'interface entre les cellules de l'épithélium pigmentées et celles de l'épithélium non pigmentées (Figure 2 B, trait blanc).

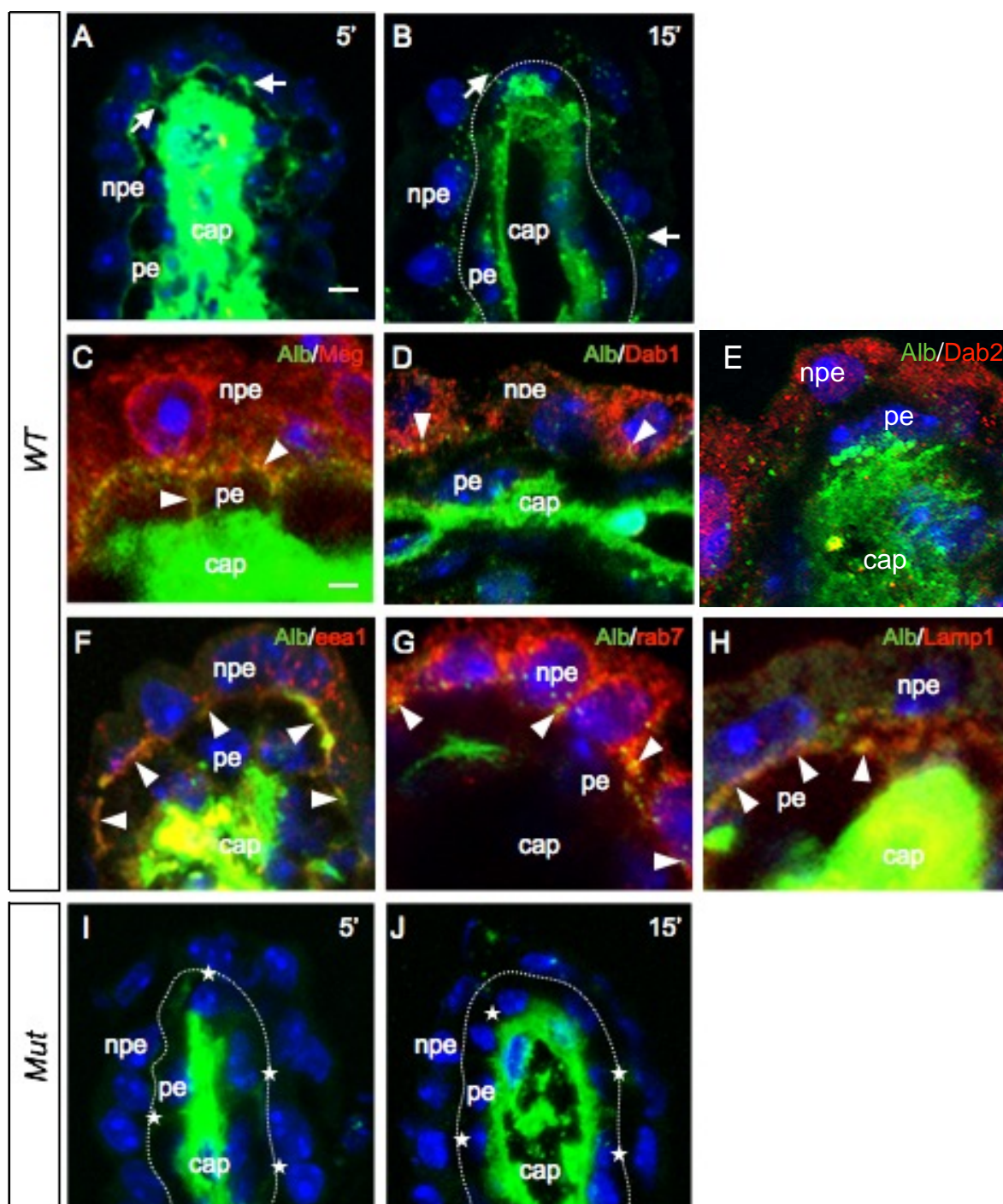


Figure 2 : La mégaline et le processus endocytaire dans le corps ciliaire

(A,J) coupe sagittale de corps ciliaire de souris contrôle adulte (A-H) et de souris mutante adulte (I-J). (A,B,I,J) Injection d'albumine fluorescente, les flèches indiquent l'albumine fluorescente, les étoiles indiquent son absence. 10 souris par lignée. Echelle = 10 μ m. (C-H) Co-marquage de l'albumine fluorescente et de la mégaline (C), Dab1 (D), Dab2 (E), eea1 (F), rab7 (G) et Lamp1 (H), les têtes de flèches indiquent la colocalisation entre l'albumine et la protéine étudiée. 5 souris par lignée. Echelle = 5 μ m. (A-J) npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté) cap (capillaire). La ligne blanche indique l'interface entre l'épithélium pigmenté et le non pigmenté.

L'albumine arrive par le capillaire et est localisé à l'interface des deux épithéliums (A, flèches) puis son marquage faiblit (B, flèches). Chez les souris mutantes il n'y a plus de marquage de l'albumine à l'interface des deux épithéliums (I,J astérisques).

L'expression d'un des ligands de la mégaline; l'albumine, colocalise avec celle des marqueurs de l'endocytose (C-H, têtes de flèches).

Pour caractériser la voie de l'internalisation de l'albumine par les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire nous avons utilisé des marqueurs de l'appareil endocytique apical.

A 5 minutes, nous avons observé une co-localisation de l'albumine avec la mégaline/lrp2, exprimée au pôle apical des cellules de l'épithélium non pigmenté du corps ciliaire (Figure 2 C, têtes de flèche). Nous avons aussi détecté une co-localisation avec la protéine Dab-1 au niveau apical de ces mêmes cellules (Figure 2 D, têtes de flèche), mais pas avec Dab-2 (Figure 2 E). Enfin nous observons aussi une co-localisation avec les protéines endosomales précoce Eea1 (Figure 2 F, têtes de flèche). Au terme des 15 minutes nous observons une co-localisation de l'albumine avec le marqueur Rab7 dans les endosomes tardifs (Figure 2 G, têtes de flèche) et le marqueur lysosomal Lamp1 (Figure 2 H, têtes de flèche). Ces résultats suggèrent que l'albumine internalisée par les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire suit la voie de dégradation clathrine-dépendante.

De manière intéressante chez les souris mutantes, que ce soit 5 minutes ou 15 minutes après l'injection de l'albumine fluorescente, nous ne détectons pas d'albumine dans les cellules des deux épithéliums du corps ciliaire (Figure 2 I et J). Ces résultats montrent que la mégaline/lrp2 est indispensable à l'internalisation de l'albumine et probablement d'autres protéines plasmatiques dans l'épithélium ciliaire.

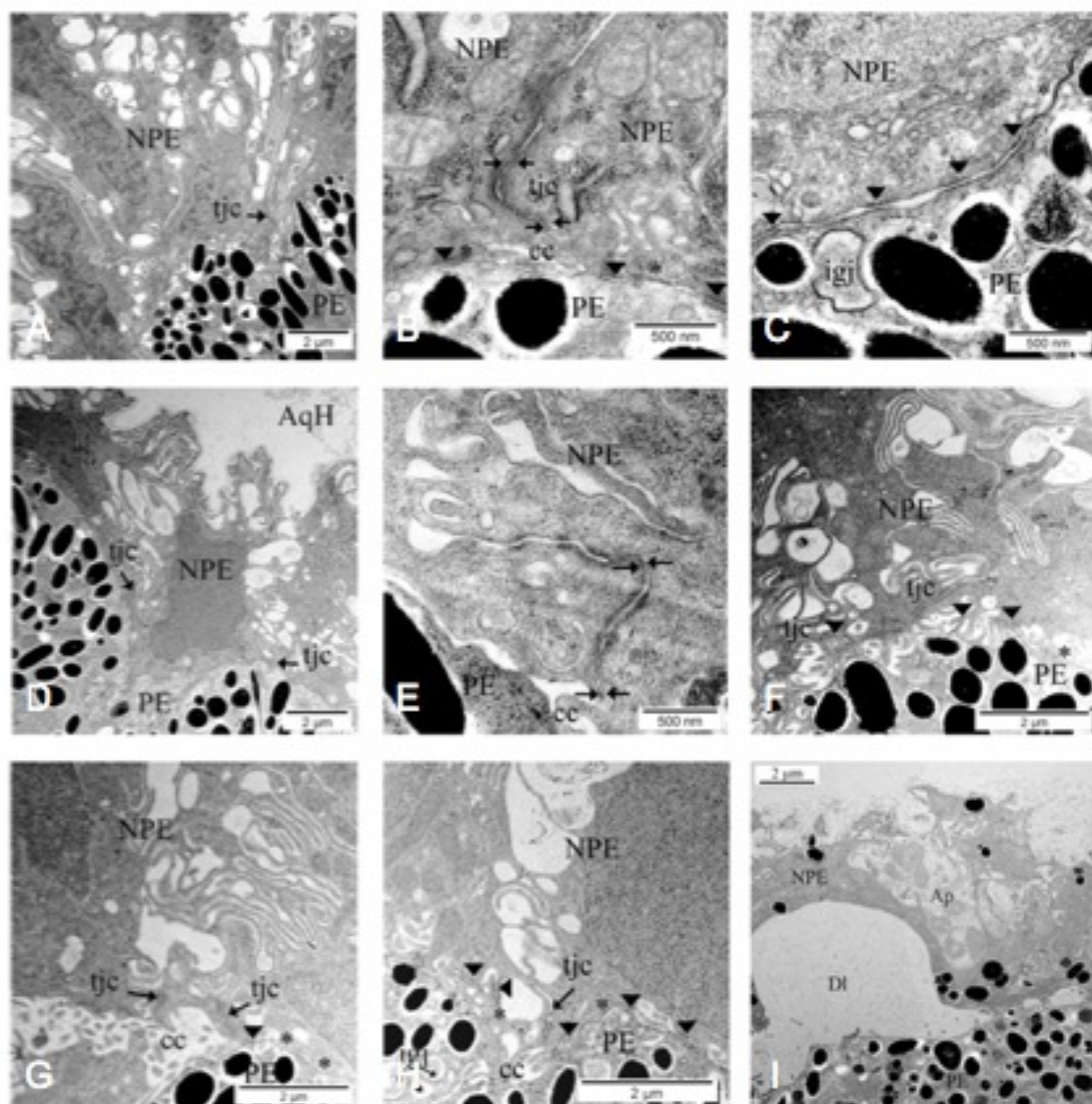


Figure 3 : Désorganisation morphologique du corps ciliaire des souris FoxG1-Cre Meg^{L/L}

(A-I) coupes ultrafines de corps ciliaire de souris contrôle âgées de trois mois (A-C), et de souris mutante âgées de trois mois (D-F), et un an (G-I), observées en microscopie électronique à transmission. npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté), tjc (jonctions serrées). cc (canal ciliaire), igj (jonctions invaginées) AqH (humeur aqueuse), Ap (autophagosome) DI (dilatation). jonctions adhérentes (tête de flèche), jonctions serrées (flèches), jonctions communicantes (astérisque). 3 souris par lignée.

Les jonctions adhérentes (tête de flèche), serrées (flèches) et communicantes (astérisque) sont localisées à l'interface des deux épithéliums (A-C). Malgré une désorganisation structurale, dans les corps ciliaires des souris mutantes, les jonctions sont situées à l'interface des deux épithéliums (D-H). A un an des grandes dilatations sont détectées à l'interface des deux épithéliums (J).

I-2-Conséquence de l'inactivation de la mégaline/lrp2 sur la structure de l'interface épithélium pigmenté/épithélium non pigmenté (PE/NPE)

Nous avons également étudié l'ultrastructure de l'épithélium ciliaire par des techniques de microscopie électronique à transmission.

Chez les souris contrôles nous retrouvons l'organisation du corps ciliaire, décrite par Raviola chez le singe et le lapin (Raviola et al., 1971). Les cellules de l'épithélium pigmenté caractérisées par la forte concentration de pigments font face au stroma, et les cellules de l'épithélium non pigmenté caractérisées par la présence d'une multitude de digitations au pôle basal font face à la chambre postérieure de l'œil (Figure 3 A). Nous pouvons distinguer des jonctions cellulaires entre les cellules non pigmentées (serrées, adhérentes, communicantes), les cellules pigmentées (adhérentes et communicantes) et à l'interface des deux (adhérentes ou punctae adherens et communicantes) (Figure 3 B et C).

Chez les souris mutantes, nous remarquons une atrophie des digitations basolatérales (Figure 3 D). Les jonctions serrées sont présentes entre les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire tandis que les jonctions adhérentes (punctae adherens, PA) et les jonctions communicantes sont présentes à l'interface des deux épithéliums (Figure 3 E et F). Mais le nombre des PA semble diminuer, elles sont moins larges et l'espace entre les cellules pigmentées et non pigmentées est augmenté (Figure 3 F et I). Ces anomalies augmentent avec l'âge, nous observons ainsi dès un an de vie postnatale des grandes dilatations à l'interface des deux épithéliums et nous remarquons aussi de moins en moins de PA (Figure 3 H-I).

L'inactivation de la mégaline/lrp2 semble affecter la structure du corps ciliaire, en entraînant de manière directe ou indirecte une grande désorganisation morphologique. Elle altère la mise en place des jonctions adhérentes (PA) à l'interface des deux épithéliums.

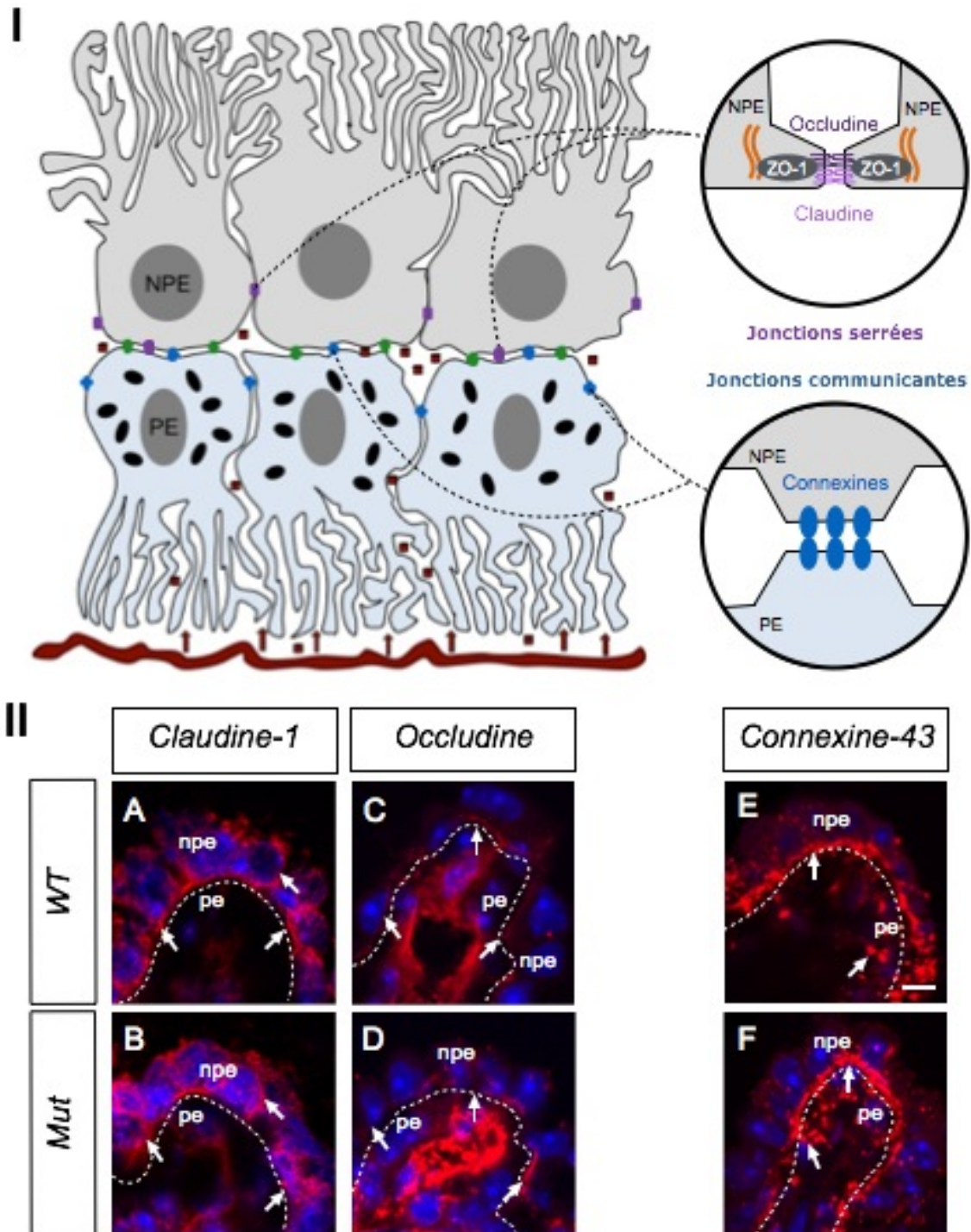


Figure 4 : Inactivation de la mégaline et mise en place des jonctions serrées et communicantes.

(I) Rappel de la représentation schématique de l'épithélium du corps ciliaire d'un oeil humain et des jonctions serrées et adhérentes NPE (Epithélium non pigmenté), PE (Epithélium pigmenté)

■ (Jonction serrée), ● (Jonction adhérente), ● (Jonction communicante), ● (mélanosome), ● (molécule sanguine), ⚡ (microfilament d'actine)

(II) (A-F) coupe sagittale de corps ciliaire de souris contrôle adulte (A,C,E) et de souris mutante adulte (B,D,F). npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté). marquage de Claudine-1 (A,B), Occludine (C,D), Connexine-43 (E,F). Les flèches indiquent le marquage de la protéine La ligne blanche indique l'interface entre l'épithélium pigmenté et le non pigmenté. 5 souris par lignée. Echelle = 10 μm.

Il n'y pas de différence dans la distribution des protéines des jonctions serrées et celles des jonctions communicantes.

I-3-Analyse immunomorphologique de l'épithélium ciliaire

Nous avons étudié l'expression des protéines qui constituent les jonctions serrées, les jonctions communicantes et les jonctions adhérentes.

Les protéines majoritaires des jonctions serrées sont l'occludine et la claudine. Nous détectons une localisation de la claudine-1 entre les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire (figure 4 A). Le même marquage est observé pour la protéine occludine (Figure 14 C). Nous n'observons pas de différence dans les marquages du corps ciliaire des souris mutantes au niveau les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire (Figure 4 B et D).

La connexine 43 (Cx-43) est la protéine majoritaire des jonctions communicantes dans l'épithélium ciliaire. Dans le corps ciliaire des souris contrôles nous pouvons voir un marquage continu entre les cellules de l'épithélium non pigmenté et les cellules de l'épithélium pigmenté, mais aussi entre les cellules de l'épithélium pigmenté (Figure 4 E). Nous observons le même marquage dans le corps ciliaire des souris mutantes que ce soit entre les cellules de l'épithélium pigmenté et non pigmenté mais aussi entre les cellules de l'épithélium pigmenté (Figure 4 F).

ZO-1 est aussi une protéine impliquée dans les jonctions adhérentes, composées de nectines, cadhérines, d'afadine et de caténines. Dans le corps ciliaire des souris contrôles, nous observons un marquage continu qui reflète le réseau annulaire des jonctions serrées et adhérentes autour des cellules de l'épithélium non pigmenté, au niveau apical (Figure 5 A). De manière intéressante le marquage observé dans le corps ciliaire des souris mutantes est distribué de manière discontinu (Figure 5 B).

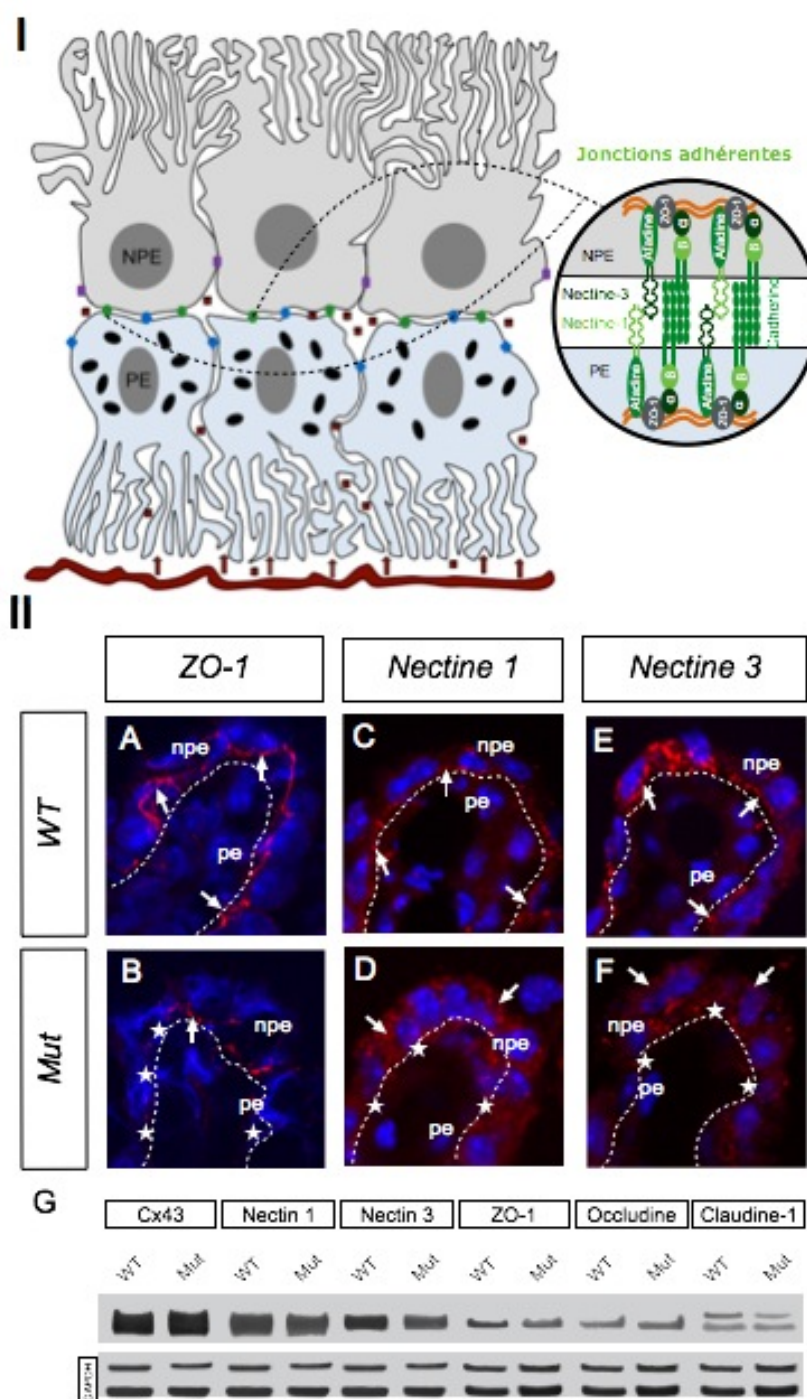


Figure 5 : Redistribution des protéines des jonctions adhérentes.

(I) Rappel de la localisation des jonctions adhérentes dans l'épithélium ciliaire.

(II) (A-F) coupe sagittale de corps ciliaire de souris contrôle adulte (A,C,E) et de souris mutante adulte (B,D,F). npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté). marquage de ZO-1 (A,B), Nectine 1 (C,D), Nectine 3 (E,F). Les flèches indiquent le marquage de la protéine. La ligne blanche indique l'interface entre l'épithélium pigmenté et le non pigmenté. 5 souris par lignée. Echelle = 10 μ m.

(G) western blots sur lysats de corps ciliaire de souris contrôle adulte (WT) et mutante (Mut). Détection de la protéine connexine-43 (cx43), nectine 1, nectine 3, ZO-1, occludine et claudine-1. 12 souris par lignées.

Alors que les protéines des jonctions adhérentes se trouvent à l'interface des deux épithéliums chez les souris contrôles (A,C,E), elles se retrouvent délocalisées chez les souris mutantes (B,D,F). Il n'y a pas de différence dans l'expression de ces mêmes protéines entre les deux lignées (G)

Nous nous sommes ensuite concentrés sur la détection de la nectine 1 et de la nectine 3, marqueurs spécifiques de l'interface PE-NPE au niveau des PA (Inagaki et al., 2005). Dans le corps ciliaire des souris contrôles nous observons un marquage des deux protéines très fin et uniforme, qui se situe à l'interface des deux épithéliums (Figure 5 C et E). Dans le corps ciliaire des souris mutantes, le marquage est conservé entre deux cellules adjacentes de l'épithélium non pigmenté mais il devient très discontinu à l'interface entre les cellules pigmentées et les cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire (Figure 5 D et F).

Nous avons analysé l'expression de ces différentes protéines par western blot. Nous ne détectons pas de différence quantitative dans le niveau d'expression de ces différents marqueurs entre le corps ciliaire des souris contrôles et celui des souris mutantes (Figure 5 G).

L'afadine, la protéine cytosolique qui lie les nectines au cytosquelette d'actine est localisée, chez les souris contrôles, au niveau de l'interface apicale entre les deux épithéliums où elle co-localise avec un marqueur du cytosquelette d'actine; la phalloïdine (Figure 6 A). Dans le corps ciliaire des souris mutantes le marquage de la phalloïdine et de l'afadine devient discontinu (Figure 6 B).

Une autre protéine importante pour le maintien de la jonction adhérente est la cadhérine et ses effecteurs cytosoliques les caténines. Chez les souris contrôles la bêta-caténine est retrouvée à l'interface des deux épithéliums (Figure 6 C). Or chez les souris mutantes, comme pour l'afadine elle n'est plus distribuée à la membrane apicale des deux épithéliums (Figure 6 D). Il est possible que la mauvaise distribution des nectines dans les cellules de l'épithélium non pigmenté du corps ciliaire chez les souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}* empêcherait le regroupement des cadhérines et leurs effecteurs.

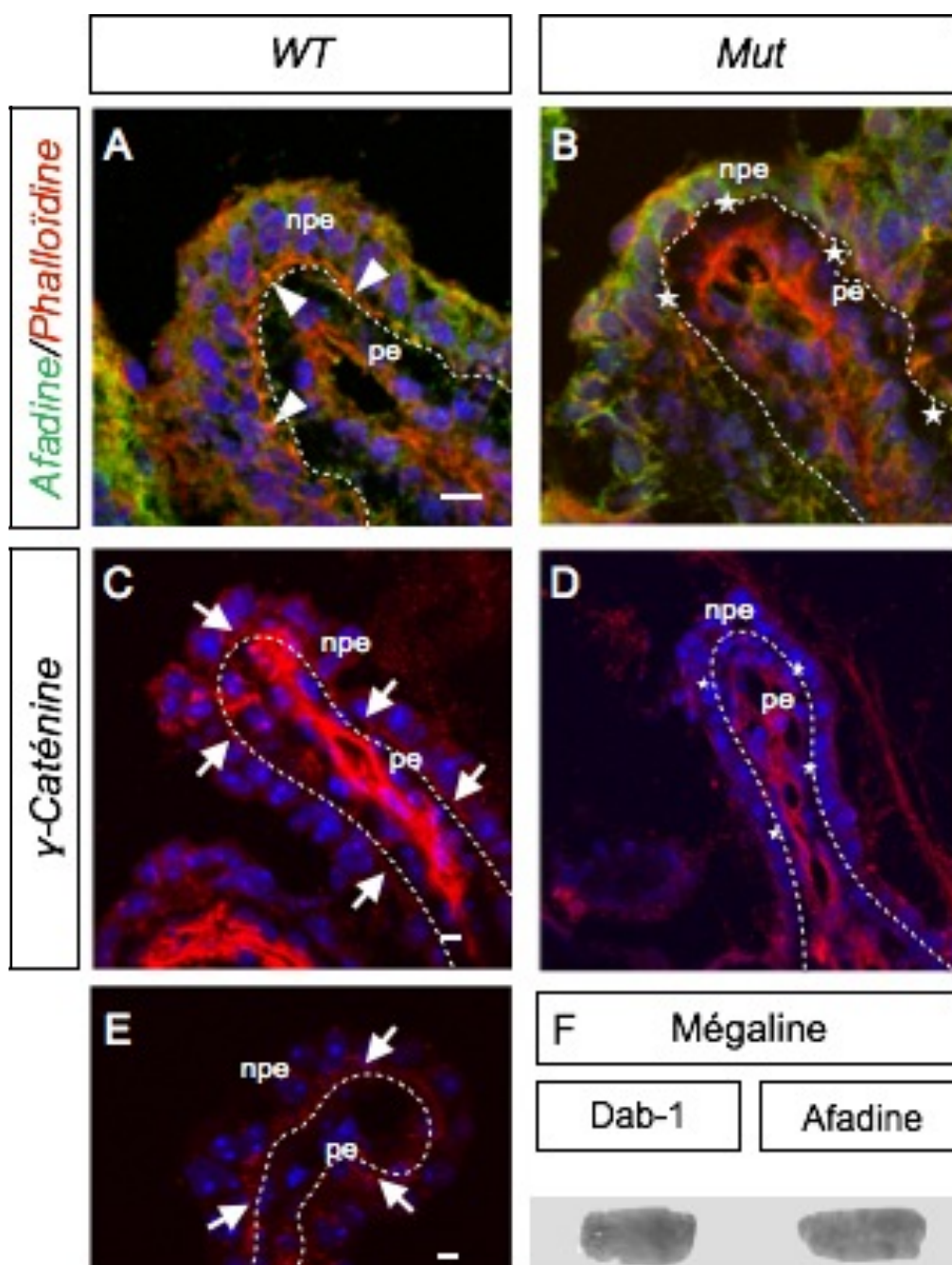


Figure 6 : La mégaline/Irp2 et la jonction adhérente

(A-D) coupe sagittale de corps ciliaire de souris contrôle adulte (A,C,E) et de souris mutante adulte (B,D). marquage de l'afadine et la phalloïdine (A,B), γ -caténine (C,D). npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté). 5 souris par lignée. Echelle = 10 μ m. (E) Duolink sur coupe sagittale de corps ciliaire de souris contrôle adulte. npe (épithélium non pigmenté), pe (épithélium pigmenté). 5 souris par lignée. Echelle = 10 μ m. (A-E) Les têtes de flèches indiquent la colocalisation entre l'albumine et l'afadine, les flèches indiquent le marquage de la protéine, les étoiles indiquent son absence La ligne blanche indique l'interface entre l'épithélium pigmenté et le non pigmenté.

(F) Co-immunoprécipitation sur lysats de corps ciliaire de souris contrôle adulte de la mégaline/ Dab-1 et mégaline/Afadine. 6 souris par lignée.

Alors que l'afadine est localisée à l'interface des deux épithéliums chez les souris contrôles (A têtes de flèches), elle n'y est pas détectée chez les souris mutantes (B, astérisques) de même pour la γ -caténine (C,D). Une interaction entre la mégaline et les protéines des jonctions adhérentes est mis en évidence; nectine 1 (E), Dab-1 et l'afadine (F).

Tous ces résultats indiquent que les jonctions serrées et communicantes sont potentiellement préservées dans le corps ciliaire des souris *FoxG1-Cre Meg^{L/L}*. De manière intéressante seules les jonctions adhérentes, situées entre les cellules pigmentées et non pigmentées de l'épithélium ciliaire (*puncta adherens*), semblent affectées par l'inactivation de la mégaline/lrp2.

Nous avons testé l'hypothèse que la mégaline/lrp2 était un effecteur de la voie des nectines. Pour cela nous avons eu recours à des techniques de Duolink, qui permettent de mettre évidence les interactions entre deux protéines par immunofluorescence. Ainsi nous avons mis en lumière une interaction entre la mégaline/lrp2 et la nectine 1 (Figure 6 E). Des techniques de co-immuprécipitation nous ont permis aussi de montrer une interaction entre la mégaline/lrp2 et l'afadine et de confirmer celle, entre la mégaline/lrp2 et Dab-1 (Figure 6 F).

Ces expériences préliminaires montrent que la mégaline/lrp2, Dab-1, l'afadine et la nectine 1 forment un complexe qui pourrait participer à la stabilisation des PA au niveau de l'interface PE-NPE. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse.

DISCUSSION GENERALE

I-Myopie forte et mégaline/Lrp2

L'identification de facteurs génétiques est un axe de recherche majeur et actif dans le domaine de la myopie forte. Des études récentes d'associations géniques sur de larges cohortes de patients ont permis de distinguer de nombreuses régions génomiques susceptibles d'être importantes pour l'apparition ou la progression de la myopie forte. Pour beaucoup de ces études les séquences génomiques sont non-codantes ou associées à des gènes dont le rôle dans la croissance oculaire est très difficile à établir (Hysi et al., 2010, Thorleifsson et al., 2010). Parallèlement à ces études à grande échelle, un petit nombre de gènes a été identifié grâce à leur association directe avec un syndrome à caractère monogénique ou la myopie forte est l'un des phénotypes, comme dans le syndrome de Stickler et le syndrome Donnai-Barrow. Dans ce dernier syndrome, c'est la perte de fonction de la mégaline/lrp2 qui entraîne très probablement cette combinaison de pathologies.

L'association directe de la mégaline/lrp2 avec la croissance oculaire a été initialement montrée chez le poisson zèbre. L'analyse du mutant « *Bugeye* » montre une association entre une perte de fonction de la mégaline/lrp2 et une augmentation anormale de la longueur axiale (Veth et al., 2011). Ce phénotype est aussi associé à une augmentation anormale de la pression intraoculaire, à une rétinopathie modérée et à une augmentation des protéines de stress mécanique. De manière surprenante, la mutation est à pénétrance variable ; environ 10% des *mutants* présentent ce phénotype. Finalement, le modèle *bugeye* se distingue du syndrome Donnai-Barrow, en effet les patients DBS sont tous myopes forts et ne présentent pas de pression intraoculaire élevée.

Pour montrer directement l'effet de la mégaline/lrp2 dans l'apparition ou la progression de la myopie forte associée au syndrome Donnai-Barrow, nous avons généré une lignée de souris mutante dans laquelle le gène de la mégaline/lrp2 a été inactivé conditionnellement dans les dérivés du prosencéphale antérieur, c'est à dire la rétine neurale, la rétine pigmentaire et l'épithélium ciliaire. Cette lignée de souris est viable et présente un phénotype ophtalmologique majeur ; elle se distingue par un allongement exubérant de l'axe oculaire associé à une dégénérescence de la rétine et un amincissement de la sclère. Cette inactivation conditionnelle est provoquée par l'expression de la *Cre* recombinase sous le contrôle du facteur de transcription *Foxg1*.

L'analyse morphologique grossière *in vivo* montre une augmentation anormale de la taille et de la morphologie de l'œil dans la lignée mutante. L'analyse des données IRM *in vivo* au cours du développement postnatal de l'œil permet de définir les critères ophtalmologiques de cet accroissement excessif de la taille de l'œil. En résumé, l'analyse montre que cet accroissement est associé à une augmentation anormale de la longueur axiale. La longueur axiale de l'œil est une combinaison de plusieurs critères, qui sont la profondeur de la chambre antérieure, l'épaisseur du cristallin et la profondeur de la chambre du vitré. Nous remarquons que l'augmentation de la longueur axiale est totalement liée à l'augmentation anormale de la chambre du vitré. Cette augmentation de la longueur axiale est progressive, cependant la vitesse de l'accroissement est grande durant la période allant de P15 à trois mois de vie postnatale. Nous observons aussi un paramètre très important de la myopie forte qui est la formation du staphylome postérieur.

L'augmentation de la longueur n'est pas accompagnée par une augmentation ou diminution significative de la pression intraoculaire ce qui suggère que le mutant *FoxG1creMeg^{lox/lox}* ne constitue pas un modèle de glaucome congénital. L'analyse du segment antérieur par lampe à fente ne montre pas non plus d'accroissement significatif du segment antérieur, c'est-à-dire de l'espace entre le cristallin et la cornée, indiquant que le mutant n'est pas buphtalmique.

L'analyse IRM *in vivo* est limitée par la taille des yeux, mais elle permet de montrer que la pathologie est déjà présente à P15. L'analyse histologique vitale en Nissl, bien que biaisée par de nombreux artéfacts liés à la fixation, coupe et traitement des sections permet de mieux définir la période d'initiation de l'augmentation anormale de la longueur axiale. Nous n'observons aucune modification pendant la période prénatale. La longueur axiale augmente anormalement et de manière significative à partir de P7. L'utilisation de marqueurs de différenciation (Tuj1) et de spécification (Pax6, Otx2) ne montre pas d'anomalie développementale dans la rétine mutante. De même, il n'y a pas d'anomalie dans l'index de prolifération de la rétine. Ces résultats confirment l'analyse histologique.

L'analyse histologique vitale permet aussi d'observer une diminution concomitante de l'épaisseur de la rétine avec l'augmentation anormale de la longueur axiale. Cette diminution d'épaisseur de la rétine n'est pas homogène; chaque couche a son propre taux de réduction. En particulier la couche des neurones bipolaires et la couche des photorécepteurs sont les premières et les plus grandement affectées, en conséquence les couches plexiformes diminuent très fortement. Cette diminution, bien que progressive est massive entre P7 et P45. A partir de P45, le taux de réduction décélère nettement pour

atteindre un taux continu mais minimal à partir de P90. A ce stade de l'analyse il est difficile d'établir quelque chose pour la monocouche des cellules ganglionnaires, cependant nous pouvons observer une "dispersion" des neurones dans cette couche. L'utilisation de marqueurs spécifiques à chaque couche (PKC pour les neurones bipolaires par exemple) confirme l'analyse vitale avec une réduction massive et progressive des neurones bipolaires et des photorécepteurs. Les couches plexiformes formées respectivement par le plexus de connexions entre les photorécepteurs et les neurones bipolaires (couche plexiforme interne) et le plexus de connexions entre les neurones bipolaires et les cellules amacrines et les dendrites des neurones ganglionnaires sont affectées simultanément. Les cellules de la glie de Muller ne semblent pas affectées bien que leurs prolongements soient plus épais (visible avec le marqueur GFAP). Comme pour les neurones ganglionnaires il est difficile à ce stade de savoir si le nombre de ces cellules est affecté. Pour les cellules ganglionnaires il est clair que la densité apparente est diminuée; la diminution du nombre d'axones observé après P45 indique cependant que le nombre de ces cellules réduit progressivement.

Cette rétinopathie progressive est visible de manière macroscopique en utilisant l'imagerie du fond de l'œil.

Nous nous sommes intéressés au mécanisme moléculaire susceptible de provoquer une telle réduction d'épaisseur de la rétine. Nous observons une augmentation très importante de la mort cellulaire dans les couches bipolaires et des photorécepteurs pendant la période définie par l'histologie, c'est-à-dire entre P7 et P45. Parallèlement à l'analyse de la mort cellulaire par la méthode TUNEL, nous avons observé une augmentation des profils cellulaires immunopositifs à la caspase 3 activée. Tout ceci suggère que pendant la période critique P7-P45, les cellules bipolaires et les photorécepteurs sont particulièrement sensibles aux forces d'étirement subies par la rétine. A cet égard nous observons une augmentation importante des niveaux d'expression des protéines de stress Hsp70 et Hsp25 en immunocytochimie au niveau des cellules bipolaires et en western blot au niveau de la rétine. Au niveau des cellules bipolaires nous observons aussi une augmentation concomitante des marqueurs d'autophagie ATg12 et LC-3II. Ceci suggère que la réponse des neurones bipolaires aux forces d'étirement est une augmentation des mécanismes de survie autophagique, via Hsp70-ATg12 et LC3-II. Cette augmentation anormalement élevée (en durée et/ou en intensité) mène très probablement à la mort cellulaire. Concernant les photorécepteurs, nous n'avons pas de mécanisme aussi clair. Les cellules ganglionnaires semblent plus

résistantes à l'étirement anormal subi par la rétine mutante. Nous observons souvent des cellules ganglionnaires dispersées avec le corps cellulaire incliné. En réponse à l'étirement nous observons aussi une augmentation de la protéine Hsp70 et des marqueurs autophagiques Atg12 et LC-3II. A ce stade de l'analyse nous ne savons pas si ce mécanisme de survie est plus efficace en intensité ou durée dans les cellules ganglionnaires.

Nous avons analysé un autre paramètre important de la myopie forte qui est l'état de la sclère. La sclère est aussi un très bon indicateur de l'étirement du globe oculaire. L'analyse en coloration vitale montre une diminution progressive et massive de l'épaisseur de la sclère en fonction du degré d'augmentation de la longueur axiale. Au niveau ultrastructural nous observons que cet amincissement se caractérise par une diminution des fibres de collagène. Les fibres de collagène subissent aussi des changements morphologiques importants ; d'une part les fibres ne présentent plus un calibrage homogène centré autour de 90-110 nm de diamètre, mais un étalement avec une présence anormale de fibres avec des diamètres fins (20-30 nm) ou avec des diamètres élevés (180-200 nm), et d'autre part les fibres ne paraissent plus enroulées mais rectilignes.

Tous ces éléments phénotypiques sont caractéristiques de la myopie forte et permettent d'indiquer que le modèle *FoxG1Meg^{lox/lox}* constitue un bon modèle génétique de la myopie forte présente chez les patients Donnai-Barrow.

II-Analyse de la chambre du vitré

Nos analyses montrent clairement que l'augmentation de la longueur axiale est très majoritairement liée à l'augmentation de la longueur de la chambre du vitré. Elle est normalement remplie par l'humeur vitrée, un gel hydrophile qui occupe l'espace entre le cristallin et la membrane « limitants » recouvrant la rétine. A l'état normal la fraction d'humeur vitrée liquide est faible et augmente potentiellement avec l'âge.

Dans nos *mutants* nous observons que la masse de gel d'humeur vitrée est identique et que celle-ci est collée au cristallin. La dissection indique aussi la présence anormale d'un fluide translucide, acellulaire qui remplit la cavité du vitré, du gel sub-cristallin à la rétine. Ce caractère phénotypique n'avait jamais été décrit avant. Dans un premier temps nous avons analysé biochimiquement le fluide extrait du gel vitréen d'une souris normal. Le fluide présente les caractéristiques de l'humeur aqueuse ; c'est-à-dire une faible concentration en protéines (50 fois moins) et une augmentation de l'osmolarité par rapport au plasma. Le fluide mutant est significativement différent du fluide normal ; il contient deux fois plus de protéines et présente une diminution de l'osmolarité, et les niveaux de fer et de calcium sont anormalement élevées.

Finalement, en collaboration avec Pascal Cosette nous avons caractérisé par spectrométrie de masse le protéome du fluide. Sur les 445 protéines identifiées dans le protéome normal, seules une vingtaine d'entre elles présentent une différence significative. L'analyse en « clustering » de ces protéines indique seulement deux fonctions physiologiques susceptibles d'être modifiées chez les souris mutantes. La première fonction est liée à la présence anormalement élevée de protéines plasmatiques comme l'albumine et l' α 1 anti-trypsine suggérant un défaut dans le filtrage (capture/clairance) des protéines plasmatiques du sérum vers la chambre du vitré. La deuxième fonction est liée à la forte diminution des protéines assurant la protection des tissus oculaires (nombreuses cristallines) contre le stress oxydatif, suggérant que le statut protecteur du fluide de la chambre du vitré soit modifié.

La nature des modifications biochimiques pourrait suggérer qu'elles résultent des dysfonctions au niveau de l'épithélium ciliaire.

III-Fonction de la mégaline/lrp2 dans l'internalisation des protéines plasmatiques au niveau de l'interface PE-NPE

Les cellules endothéliales des capillaires du corps ciliaire sont fenêtrés permettant ainsi le passage passif de certaines macromolécules du sérum vers le stroma ciliaire. L'eau et les ions suivent à la fois le gradient osmotique entre la pression sanguine et la pression intraoculaire et un transport actif. Au niveau du stroma, les protéines (macromolécules) diffusent vers l'interface entre PE et NPE comme montré par Raviola (Raviola, 1974). Cette diffusion est probablement passive suivant le seul gradient oncotique et selon une constante qui reste à définir sachant qu'aucune étude de la matrice extracellulaire du stroma ciliaire n'a été pour le moment effectuée. Au niveau de l'interface, les jonctions serrées présentes entre les cellules du NPE stoppent la diffusion des protéines vers la chambre du vitré. Quel est le devenir de ces protéines piégées au niveau de l'interface ? Le retour vers la circulation capillaire ciliaire n'étant pas envisageable, certains auteurs ont proposé une élimination de ces macromolécules grâce à une diffusion à travers le stroma de l'iris vers l'angle irido-cornéen. Une autre hypothèse jamais testée pourrait envisager une élimination des protéines plasmatiques par les cellules du NPE ou PE après internalisation.

L'injection d'Albumine fluorescente dans la circulation sanguine montre comme prévu une diffusion des ces macromolécules au niveau de l'interface et leur internalisation par les cellules du NPE. Cette protéine est successivement co-localisée avec la mégaline/lrp2 au niveau apical, avec le marqueur d'endocytose précoce EEA1 et avec le marqueur de lysosomes Lys1 suggérant qu'elle suive la voie d'endocytose dégradative. Chez les *mutants* aucune internalisation dans les cellules du NPE n'est observée montrant que la mégaline/lrp2 est l'acteur principal de l'internalisation des protéines plasmatiques par les cellules du NPE. Le devenir des macromolécules plasmatiques chez le mutant n'est pour l'instant pas connu.

IV-Analyse ultrastructurale de l'interface PE-NPE

L'interface PE-NPE est une structure morphologique unique. En effet il s'agit d'une apposition de deux épithéliums qui se font face par leurs pôles apicaux. Ces deux épithéliums adoptent une morphologie particulière au niveau apical où leurs membranes plasmiques ne présentent pas d'expansions cytoplasmiques. Ils forment des complexes jonctionnels constitués d'une succession de jonctions communicantes et adhérentes (ou *punctae adherens*). La fonction de barrière hémato-aqueuse de l'interface PE-NPE est caractérisée par les jonctions serrées entre les cellules du NPE. Alors que les jonctions communicantes participent pleinement à la fonction sécrétoire des cellules du NPE, les jonctions adhérentes participent à la formation et le maintien de cette morphologie particulière. En effet l'invalidation des nectine-1 et nectine-3, molécules indispensables à l'assemblage des jonctions adhérentes entraîne la dissociation de l'interface PE-NPE. D'un point de vue phénotypique, ces souris sont microphthalmiques suite à une diminution importante de la chambre du vitré (Inagaki et al., 2005).

Chez les *mutants* mégaline/Irp2, l'interface PE-NPE est désorganisée. Elle est beaucoup moins linéaire que chez les souris contrôle et présente une réduction dans la taille et le nombre des jonctions adhérentes (*punctae adherens*). Les membranes PE et NPE ne sont pas apposées et des dilatations fréquentes sont observées. Ces dilatations contiennent des petits prolongements cytoplasmiques provenant des cellules du NPE et PE. Au niveau apico-latéral des cellules NPE, les jonctions communicantes et les jonctions serrées suivies d'une jonction adhérente typique, paraissent normales.

Le pôle baso-latéral des cellules du NPE est aussi affecté et présente des prolongements moins nombreux et moins épais.

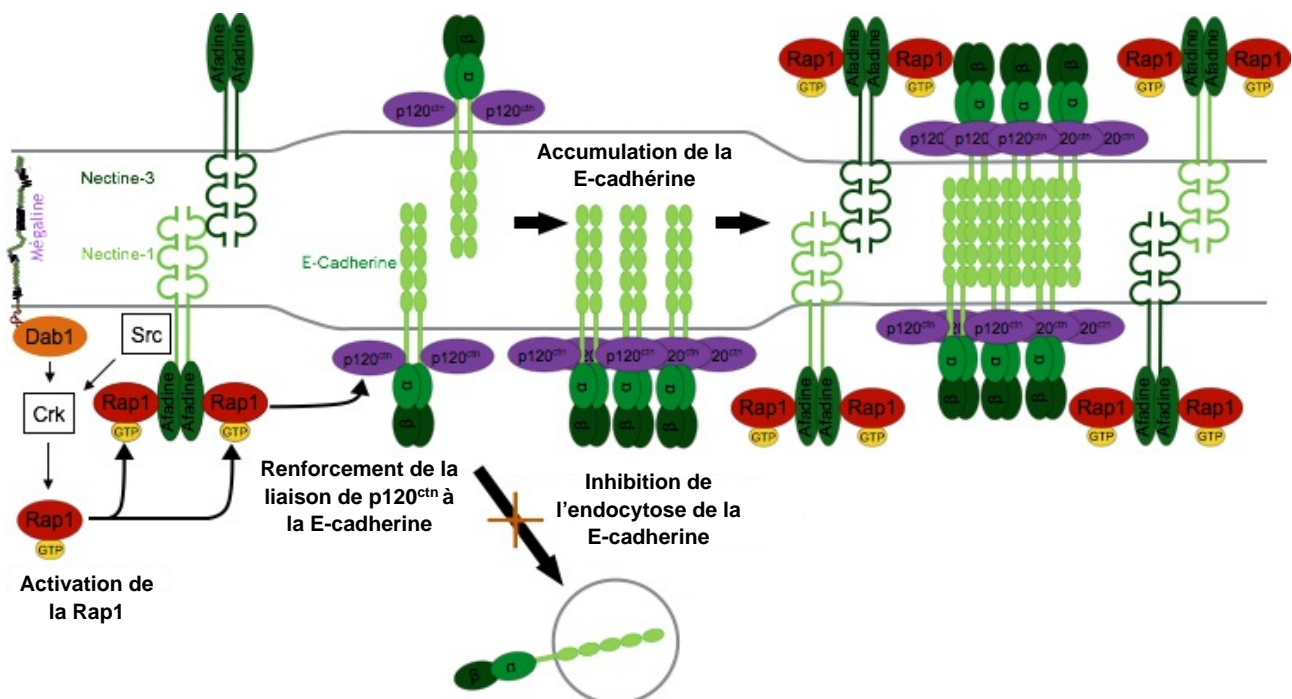


Figure 1 : Mécanisme moléculaire supposé de formation des jonctions adhérentes

L'activation concomitante de Dab1 via la mégaline et la protéine Src via la nectine pourrait induire l'activation de Rap1 qui activerait le recrutement et l'afadine au niveau de la partie cytoplasmique de la nectine 1. Une fois l'afadine activée celle ci entrainerait le recrutement et l'activation de la gamma-caténine au niveau des cadhérines. Cette activation entrainerait la stabilisation et l'agrégation des cadhérines au niveau des jonctions adhérentes.

V-Analyse moléculaire de l'interface PE-NPE

La morphologie apicale des épithéliums PE et NPE au niveau de l'interface dépend des jonctions adhérentes (*punctae adherens*). L'analyse des souris invalidées nectine-1 et nectine-3 montrent l'importance de ces molécules dans la formation et le maintien de ces jonctions adhérentes au niveau de l'interface (Inagaki et al., 2005). Les nectines sont des molécules d'adhésion de la super famille des immunoglobulines, elles trans-interagissent par leurs domaines extra-cellulaires et indépendamment du calcium. Elles peuvent interagir de manière homophilique ou hétérophilique. Les nectines interagissent par leurs domaines cytoplasmiques avec l'afadine, une protéine plateforme reliant les nectines au cytosquelette d'actine. Les nectines initient les premiers contacts et contribuent au recrutement des cadhérines, participant ainsi à la formation et à la stabilisation/maintien des jonctions adhérentes (Figure 1). Les mécanismes par lesquels les nectines recrutent les cadhérines sont complexes et nécessitent l'activation de l'afadine entre autres par la petite GTPase Rap1 (Figure 1). Chez une souris normale nous observons au niveau de l'interface PE-NPE l'expression de la nectine-1, de la nectine-3, de l'afadine, de la pancadhérine, et de la bêta-caténine. Chez les *mutants* la localisation des nectines devient punctiforme à la membrane apicale; l'afadine, la cadhérine et la bêta-caténine ne sont plus accumulées en zone apicale (Figure 2).

Nous avons essayé d'identifier le lien entre la mégaline/lrp2 et la formation/maintien des jonctions adhérentes. Nos expériences de pontage protéique sur sections montrent que la nectine-1 et la mégaline/lrp2 sont proches physiquement à la membrane apicale. Cette proximité pourrait moduler l'activité de la nectine-1 en la stabilisant à la membrane ce qui pourrait favoriser le recrutement de l'afadine au niveau des cellules du NPE. L'activité de l'afadine dépend de l'activité de rap1. L'activité de rap1 à la membrane dépend d'un complexe de signalisation formé par Crk-CI3G-Crl voie qui pourrait être activée par la protéine Dab1 ligand connu de la mégaline/lrp2 (Figure 1). Nous avons confirmé cette interaction dans des extraits de corps ciliaire et aussi montré qu'en l'absence de mégaline/lrp2 Dab1 n'est plus spécialement accumulé à la membrane. Ces résultats préliminaires indiquent un rôle potentiel de la mégaline/lrp2 dans l'activation de l'afadine donc dans la stabilisation des jonctions adhérentes via Dab1. Des expériences futures seront nécessaires pour affiner l'étude du rôle de Dab1 sur rap1, ou le rôle de rap1 sur l'afadine.

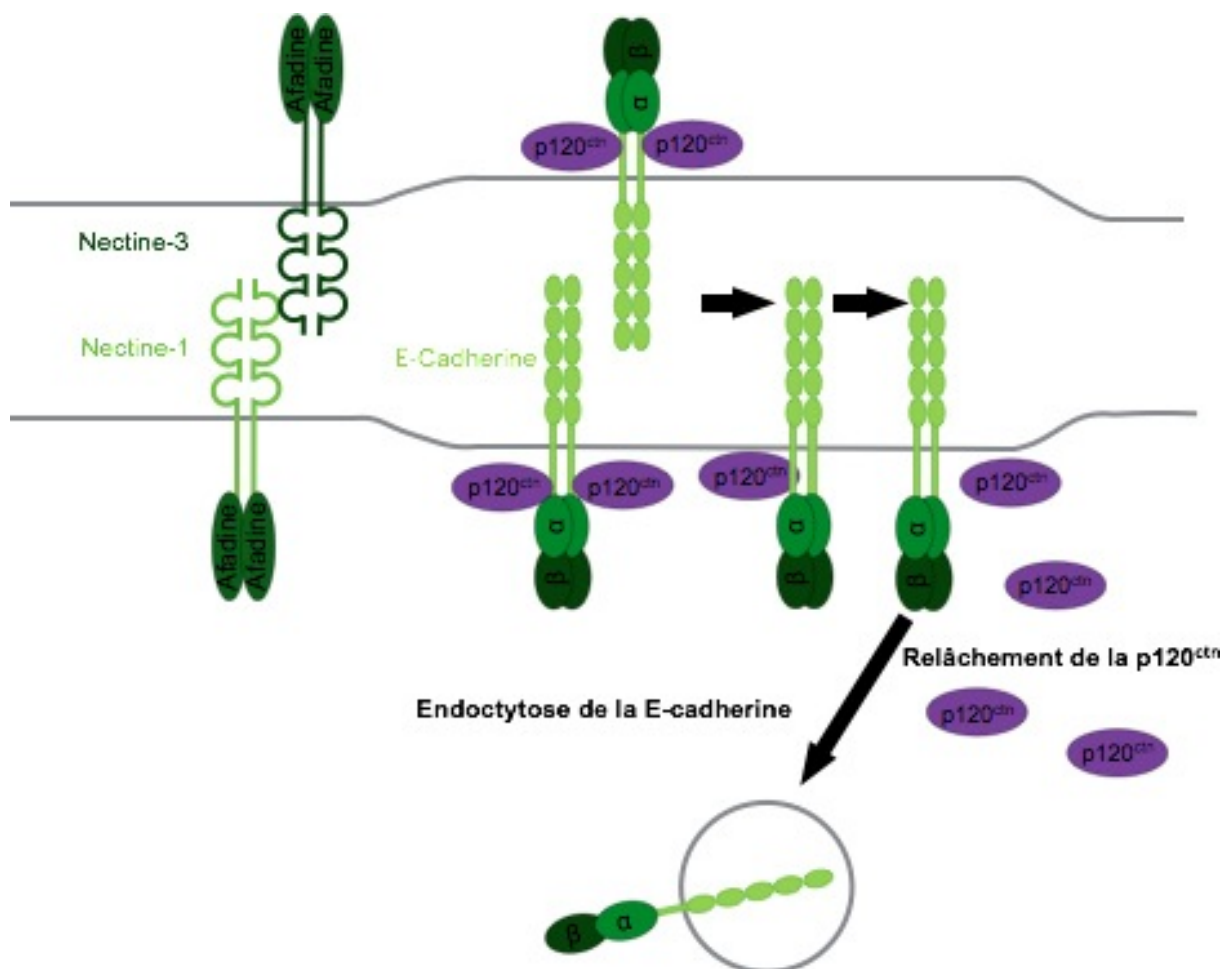


Figure 2 : Inactivation de la mégaline/Irp2 et endocytose des cadhérines

L'inactivation de la mégaline entraînerait une perte d'activation (ou grande diminution) de l'afadine au niveau des nectines. Ceci aurait pour conséquence de provoquer une endocytose et une dégradation rapide des cadhérines à la membrane.

En parallèle à la continuité des expériences initiées, ce modèle génétique pourrait ouvrir de nouvelles perspectives; il pourrait être utilisé pour tester des traitements médicamenteux; tels que les inhibiteurs de la synthèse de l'humeur aqueuse et de l'autophagie. Il pourrait être aussi utile pour analyser les propriétés physicochimiques de la rétine, de la sclérotique et la choroïde myopes au fil du temps. Les résultats qui en découleront seraient utilisables pour orienter les traitements des patients. Enfin, d'un point de vue expérimental, ce nouveau modèle pourrait permettre l'identification du ligand et/ou le domaine de la mégaline/lrp2 nécessaire pour la formation de l'épithélium ciliaire et la croissance oculaire via des techniques de sur-expression et inactivation ciblée du récepteur ou des autres protéines adaptatrices.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H., Kemler, R. (1996) Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. *J Biol Chem.* 271(3):1520-6.
- Ahle, S., Ungewickell, E. (1990) Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol.* 111(1):19-29.
- Ahmad, N.N., McDonald-McGinn, D.M., Dixon, P., Zackai, E.H., Tasman, W.S. (1996) PCR assay confirms diagnosis in syndrome with variably expressed phenotype: mutation detection in Stickler syndrome. *J Med Genet.* 33(8):678-81.
- Amsellem, S., et al. (2010) Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21(11):1859–1867.
- Annunen, S., Korkko, J., Czarny, M., Warman, M.L., Brunner, H.G., Kääriäinen, H., Mulliken, J.B., Tranebjaerg, L., Brooks, D.G., Cox, G.F., Cruysberg, J.R., Curtis, M.A., Davenport, S.L., Friedrich, C.A., Kaitila, I., Krawczynski, M.R., Latos-Bielenska, A., Mukai, S., Olsen, B.R., Shinno, N., Somer, M., Vikkula, M., Zlotogora, J., Prockop, D.J., Ala-Kokko, L. (1999) Splicing mutations of 54-bp exons in the COL11A1 gene cause Marshall syndrome, but other mutations cause overlapping Marshall/Stickler phenotypes. *Am J Hum Genet* 65:974–983.
- Arnaud, L., Ballif, B.A., Forster, E., Cooper, J.A. (2003) Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr. Biol* 13, 9–17.
- Ashby, R.S., Schaeffel, F. (2010) The effect of bright light on lens compensation in chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(10):5247-5253
- Ashton, G.C. (1985) Segregation analysis of ocular refraction and myopia. *Hum Hered* 35:232–239.
- Assémat, E., Vinot, S., Gofflot, F., Linsel-Nitschke, P., Illien, F., Châtelet, F., Verroust, P., Louvet-Vallée, S., Rinninger, F., Kozyraki, R. (2005) Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biol Reprod* 72(5):1079-86.
- Assémat, E., Chatelet, F., Chandellier, J., Commo, F., Cases, O., Verroust, P., Kozyraki, R. (2005b) Overlapping expression patterns of the multiligand endocytic receptors cubilin and megalin in the CNS, sensory organs and developing epithelia of the rodent embryo. *Gene Expr. Patterns* 6 (1), 69–78.
- Assmann, K.J., Lange, W.P., Tangelder, M.M., Koene, R.A. (1986) The organ distribution of gp-330 (Heymann antigen) and gp-90 in the mouse and the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 408(5):541-53.
- Avila, M.Y., Seidler, R.W., Stone, R.A., Civan, M.M. (2002) Inhibitors of NHE-1 Na⁺/H⁺ exchange reduce mouse intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(6): 1897-902.

B

- Baker, S., Booth, C., Fillman, C., Shapiro, M., Blair, M.P., Hyland, J.C., Ala-Kokko, L. (2011) A loss of function mutation in the COL9A2 gene causes autosomal recessive Stickler syndrome. *Am J Med Genet Part A* 155A:1668–1672.
- Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A., Cooper, J.A. (2004) Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr. Biol* 14, 606–610.
- Bard, J.B., & Ross, A.S. (1982) The morphogenesis of the ciliary body of the avian eye. I. Lateral cell detachment facilitates epithelial folding. *Dev Biol* 92(1):73-86.

- Bard, J.B., & Ross, A.S. (1982) The morphogenesis of the ciliary body of the avian eye. II. Differential enlargement causes an epithelium to form radial folds. *Dev Biol* 92(1): 87-96.
- Bar Dayan, Y., Levin, A., Morad, Y., et al. (2005) The changing prevalence of myopia in young adults: a 13-year series of population-based prevalence surveys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: (8): 2760-2765.
- Barsotti, M.F., Bartels, S.P., Freddo, T.F., Kamm, R.D. (1992) The source of protein in the aqueous humor of the normal monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992 Mar; 33(3):581-95.
- Bartmann, M., Schaeffel, F., Hagel, G., Zrenner, E. (1994) Constant light affects retinal dopamine levels and blocks deprivation myopia but not lens-induced refractive errors in chickens. *Vis Neurosci* 11 (2): 199-208
- Beck, K.A., Chang, M., Brodsky, F.M., Keen, J.H. (1992) Clathrin assembly protein AP-2 induces aggregation of membrane vesicles: a possible role for AP-2 in endosome formation. *J Cell Biol* 119(4):787-96.
- Bergeron, M., Gougoux, A., Noël, J., Parent, L. (2001) The renal Fanconi syndrome, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein B, Childs B, New York, McGraw-Hill, pp 5023–5038.
- Bertrand, E., Fritsch, C., Diether, S., Lambrou, G., Müller, D., Schaeffel, F., Schindler, P., Schmid, K.L., van Oostrum, J., Voshol, H. (2006) Identification of apolipoprotein A-I as a "STOP" signal for myopia. *Mol Cell Proteomics*. 5(11):2158-66.
- Bieri, S., Djordjevic, J.T., Daly, N.L., Smith, R., Kroon, P.A. (1995) Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain. *Biochemistry* 34(40):13059-65.
- Bieri, S., Atkins, A.R., Lee, H.T., Winzor, D.J., Smith, R., Kroon, P.A. (1998) Folding, calcium binding, and structural characterization of a concatemer of the first and second ligand-binding modules of the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 37(31):10994-1002.
- Birn, H., Vorum, H., Verroust, P.J., Moestrup, S.K., Christensen, E.I. (2000) Receptor associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 11(2):191-202.
- Bishop, P.N., Takanosu, M., Le Goff, M., Mayne, R. (2002) The role of the posterior ciliary body in the biosynthesis of vitreous humour. *Eye (Lond)* 16(4):454-60.
- Bloom, R.I., Friedman, I.B., Chuck, R.S. (2010) Increasing rates of myopia: the long view. *Curr Opin Ophthalmol* 21: (4): 247-248.
- Bonifacino, J.S., Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395-447.
- Brenton, D., Isenberg, D., Cusworth, D., Garrod, P., Krywawych, S. (1981) The adult presenting idiopathic Fanconi syndrome. *J Inherited Metab Dis* 4: 211–215.
- Brown, N.A., Hill, A.R. (1987) Cataract: the relation between myopia and cataract morphology. *Br J Ophthalmol*. 71(6):405-14.
- Bu, G. (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 10(5):333-44.
- Bucci, C., Alifano, P., Cogli, L. (2014) The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes (Basel)*. 4(4):642-77.
- Burke, K.A., Jauniaux, E., Burton, G.J., Cindrova-Davies, T. (2013) Expression and immunolocalisation of the endocytic receptors megalin and cubilin in the human yolk sac and placenta across gestation. *Placenta* 34(11):1105-9.
- Burton, T.C. (1989) The influence of refractive error and lattice degeneration on the incidence of retinal detachment. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 87:143–155.

C

- Calera, M.R., Topley, H.L., Liao, Y., Duling, B.R., Paul, D.L., Goodenough, D.A. (2006) Connexin43 Is Required For Production Of The Aqueous Humor In The Murine Eye. *J Cell Sci* 119(Pt 21):4510-9.
- Cassagne, M., Malecaze, F., Soler, V. (2014) Pathophysiology Of Myopia: Nature Versus Nurture. *J Fr Ophtalmol.* 37(5):407-14.
- Cases, O., Perea-Gomez, A., Aguiar, D.P., Nykjaer, A., Amsellem, S., Chandellier, J., Umbhauer, M., Cereghini, S., Madsen, M., Collignon, J., Verroust, P., Riou, J.F., Creuzet, S.E., Kozyraki, R. (2013) Cubilin, A High Affinity Receptor For Fibroblast Growth Factor 8, Is Required For Cell Survival In The Developing Vertebrate Head. *J Biol Chem.* 288(23):16655-70.
- Chavaud, D. (2001) Traitement Chirurgical Des Complications Rétiniennes De La Myopie Forte. *Rev Prat* 51: (15): 1629-1630.
- Chen, K., Ochalski, P.G., Tran, T.S., Sahir, N., Schubert, M., Pramatarova, A., Howell, B.W. (2004) Interaction Between Dab1 And Crkii Is Promoted By Reelin Signaling. *J. Cell Sci.* 117, 4527–4536.
- Chen, S.J., Lu, P., Zhang, W.F., Lu, J.H. (2012) High Myopia As A Risk Factor In Primary Open Angle Glaucoma. *Int J Ophthalmol.* 5(6):750-3.
- Chen, X., & Gumbiner, B.M. (2006) Crosstalk Between Different Adhesion Molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 18(5):572-8.
- Chetrit, D., Ziv, N., Ehrlich, M. (2009) Dab2 Regulates Clathrin Assembly And Cell Spreading. *Biochem J.* 418(3):701-15.
- Christensen, E.I., Gliemann, J., Moestrup, Sk. (1992) Renal Tubule Gp330 Is A Calcium Binding Receptor For Endocytic Uptake Of Protein. *J Histochem Cytochem* 40(10) 1481-90.
- Christensen, E.I., & Verroust, P.J. (2002) Megalin And Cubilin, Role In Proximal Tubule Function And During Development. *Pediatr Nephrol* 17(12):993-9.
- Christensen, E.I., Birn, H., Storm, T., Weyer, K., Nielsen, R. (2012) Endocytic Receptors In The Renal Proximal Tubule. *Physiology (Bethesda).* 27(4):223-36.
- Christoffersen, C., Dahlback, B., Nielsen, L.B. (2006) Apolipoprotein M: Progress In Understanding Its Regulation And Metabolic Functions. *Scand J Clin Lab Invest* 66: 631-637.
- Chun, J.T., Wang, L., Pasinetti, G.M., Finch, C.E., Zlokovic, B.V. (1999) Glycoprotein 330/ Megalin (Lrp-2) Has Low Prevalence As Mtna And Protein In Brain Microvessels And Choroid Plexus. *Exp Neurol* 157: 194-201.
- Chun, R.F., Peercy, B.E., Orwoll, E.S., Nielson, C.M., Adams, J.S., Hewison, M (2013) Vitamin D And Dbp: The Free Hormone Hypothesis Revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144 Pt A:132-7.
- Chui, T.Y., Song, H., Burns, S.A. (2008) Adaptive-Optics Imaging Of Human Cone Photoreceptor Distribution. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 25(12):3021-9.
- Chiu-Ugalde, J., Theilig, F., Behrends, T., Drebes, J., Sieland, C., Subbarayal, P., Kohrle, J., Hammes, A., Schomburg, L., Schweizer, U. (2010) Mutation Of Megalin Leads To Urinary Loss Of Selenoprotein P And Selenium Deficiency In Serum, Liver, Kidneys And Brain. *Biochem J* 431: 103-111.
- Civan M.M. & Macknight A.D. (2004) The Ins And Outs Of Aqueous Humour Secretion. *Exp Eye Res.* 78(3):625-31.
- Coca-Prados, M., Escribano, J., Ortego, J. (1999) Differential Gene Expression In The Human Ciliary Epithelium. *Prog Retin Eye Res* 18(3):403-29.
- Cohen Et Coll. (2011) Dependency Between Light Intensity And Refractive Development Under Light-Dark Cycles. *Exp Eye Res* 92: 40–46.

- Cooper, W.W. (1845) On Myopia And Presbyopia. *Prov Med Surg J.* 9(30):470-1. Coffey, K.L., Krushinsky, A., Green, C.R., Donaldson, P.J. (2002) Molecular Profiling And Cellular Localization Of Connexin Isoforms In The Rat Ciliary Epithelium. *Exp Eye Res.* 75(1):9-21.
- Cruysberg, J.R., Boers, G.H., Trijbels, J.M., Deutman, A.F. (1996) Delay In Diagnosis Of Homocystinuria: Retrospective Study Of Consecutive Patients. *Bmj.* 313(7064): 1037-40.
- Czekay, R.P., Orlando, R.A., Woodward, L., Lundstrom, M., Farquhar, M.G. (1997) Endocytic Trafficking Of Megalin/Rap Complexes: Dissociation Of The Complexes In Late Endosomes. *Mol Biol Cell.* 8(3):517-32.

D

- Daly, N.L., Djordjevic, J.T., Kroon, P.A., Smith, R. (1995) Three-Dimensional Structure Of The Second Cysteine-Rich Repeat From The Human Low-Density Lipoprotein Receptor. *Biochemistry* 34(44):14474-81.
- Daniel, J.M., Reynolds, A.B. (1995) The Tyrosine Kinase Substrate P120Cas Binds Directly To E-Cadherin But Not To The Adenomatous Polyposis Coli Protein Or Alpha-Catenin. *Mol Cell Biol.* 15(9):4819-24.
- Davis, C.G., Goldstein, J.L., Südhof, T.C., Anderson, R.G., Russell, D.W., Brown, M.S. (1987) Acid-Dependent Ligand Dissociation And Recycling Of Ldl Receptor Mediated By Growth Factor Homology Region. *Nature* 326(6115):760-5.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., Reynolds, A.B. (2003) A Core Function For P120-Catenin In Cadherin Turnover. *J Cell Biol.* 163(3):525-34.
- De, S., Kuwahara, S., Saito, A. (2014) The Endocytic Receptor Megalin And Its Associated Proteins In Proximal Tubule Epithelial Cells. *Membranes (Basel).* 4(3):333-55.
- Detry-Morel, M. (2011) Is Myopia A Risk Factor For Glaucoma?. *J Fr Ophtalmol.* 34(6): 392-5.
- Dickson, L.E., Wagner, M.C., Sandoval, R.M., Molitoris, B.A. (2014) The Proximal Tubule And Albuminuria: Really! *J Am Soc Nephrol.* 25(3):443-53.
- Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., De Yebenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., Carro, E. (2008) Megalin Mediates The Transport Of Leptin Across The Blood-Csf Barrier. *Neurobiol Aging* 29: 902-912.
- Dietz, H.C. (2001) Marfan Syndrome. *Genereviews®* [Internet]. Seattle (Wa): University Of Washington, Seattle; 1993-2014.
- Dong, F., Zhi, Z., Pan, M., Xie, R., Qin, X., Lu, R., Mao, X., Chen, J.F., Willcox, M.D., Qu, J., Zhou, X. (2011) Inhibition Of Experimental Myopia By A Dopamine Agonist: Different Effectiveness Between Form Deprivation And Hyperopic Defocus In Guinea Pigs. *Mol Vis* 17:2824-2834.
- Donnai, D., Barrow, M. (1993) Diaphragmatic Hernia, Exomphalos, Absent Corpus Callosum, Hypertelorism, Myopia, And Sensorineural Deafness: A Newly Recognized Autosomal Recessive Disorder? *Am J Med Genet* 47: 679–682.
- Drake, C.J., Fleming, P.A., Larue, A.C., Barth, J.L., Chintalapudi, M.R., Argraves, W.S. (2004) Differential Distribution Of Cubilin And Megalin Expression In The Mouse Embryo. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 277(1):163-70.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., Robertson, E.J. (1995) A Requirement For Bone Morphogenetic Protein-7 During Development Of The Mammalian Kidney And Eye. *Genes Dev.* 9, 2795–2807.

- Dudley, A.T., Robertson, E.J. (1997) Overlapping Expression Domains Of Bone Morphogenetic Protein Family Members Potentially Account For Limited Tissue Defects In Bmp7 Deficient Embryos. *Dev Dyn.* 208(3):349-62.
- Duke-Elder, S. (1970) Pathological Refractive Errors. Duke-Elder S, Ed. St. Louis: Mosby.

E

- Easter, S.S., & Jr., Hitchcock P.F. (1986) The myopic eye of the Black Moor goldfish. *Vision Res* 26: 1831–1833.
- Ellis, S., Mellor, H. (2000) The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol* 10(21):1387-90.
- Ellis, S., & Mellor, H. (2000) Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol.* 10(3):85-8. Review.

F

- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M. (1998) The Tight Junction Protein Zo-1 Establishes A Link Between The Transmembrane Protein Occludin And The Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem.* 273(45):29745-53.
- Fabre, S., Reymond, N., Cocchi, F., Menotti, L., Dubreuil, P., Campadelli-Fiume, G., Lopez, M. (2002) Prominent Role Of The Ig-Like V Domain In Trans-Interactions Of Nectins. Nectin3 And Nectin 4 Bind To The Predicted C-C'-C"-D Beta-Strands Of The Nectin1 V Domain. *J Biol Chem* 277:27006-13
- Faulkner, A. E., Kim, M. K., Iuvone, P. M., & Pardue, M. T. (2007). Head-Mounted Goggles For Murine Form Deprivation Myopia. *Journal Of Neuroscience Methods*, 161, 96–100.
- Fisher, C.E., & Howie, S.E. (2006) The Role Of Megalin (Lrp-2/Gp330) During Development. *Dev. Biol.* 296, 279–297.
- Feng, L., & Cooper, J.A. (2009) Dual Functions Of Dab1 During Brain Development. *Mol Cell Biol.* 29(2):324-32.
- Fisher, R.F. (1977) The Force Of Contraction Of The Human Ciliary Muscle During Accommodation. *J Physiol.* 270(1):51-74.
- Fisher, C.E., Howie, S.E. (2006) The Role Of Megalin (Lrp-2/Gp330) During Development. *Dev Biol* 296: 279-297
- Forgac, M., Cantley, L., Wiedenmann, B., Altstiel, L., Branton, D. (1983) Clathrin-Coated Vesicles Contain An Atp-Dependent Proton Pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(5): 1300-3.
- Flament, J. (2002) *Ophthalmologie, Pathologie Du Système Visuel*. Paris: Masson.
- Franco, S.J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S.R., MÜLer, U. (2011) Reelin Regulates Cadherin Function Via Dab1/Rap1 To Control Neuronal Migration And Lamination In The Neocortex. *Neuron* 69, 482–497.
- Freddo, T.F. (2013) A Contemporary Concept Of The Blood-Aqueous Barrier. *Prog Retin Eye Res.* 32:181-95.
- Fuchigami, T., Sato, Y., Tomita, Y., Takano, T., Miyauchi, S.Y., Tsuchiya, Y., Saito, T., Kubo, K., Nakajima, K., Fukuda, M., Hattori, M., Hisanaga, S. (2013) Dab1-Mediated Colocalization Of Multi-Adaptor Protein Cin85 With Reelin Receptors, Apoer2 And Vldlr, In Neurons. *Genes Cells.* 18(5):410-24.
- Fuchs, A. (1960) Frequency Of Myopia Gravis. *Am J Ophthalmol* 49: 1418-1419.

- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., Tsukita, S. (2002) Claudin-Based Tight Junctions Are Crucial For The Mammalian Epidermal Barrier: A Lesson From Claudin-1-Deficient Mice. *J Cell Biol.* 156(6) 1099-111.
- Furuta, Y., Piston, D. W. And Hogan, B. L. (1997). Bone Morphogenetic Proteins (Bmps) As Regulators Of Dorsal Forebrain Development. *Development* 124, 2203-2212.
- Furuta, Y., Hogan, B.L.M. (1998) Bmp4 Is Essential For Lens Induction In The Mouse Embryo. *Genes Dev.* 12, 3764–3775.

G

- Gajera, C.R., Emich, H., Lioubinski, O., Christ, A., Beckervordersandforth-Bonk, R., Yoshikawa, K., Bachmann, S., Christensen, E.I., Gotz, M., Kempermann, G., Peterson, A.S., Willnow, T.E., Hammes, A. (2010) Lrp2 In Ependymal Cells Regulates Bmp Signaling In The Adult Neurogenic Niche. *J Cell Sci* 123: 1922-1930.
- Gallagher, H., Oleinikov, A.V., Fenske, C., Newman, D.J. (2004) The Adaptor Disabled-2 Binds To The Third Psi Xnpxy Sequence On The Cytoplasmic Tail Of Megalin. *Biochimie* 86(3):179-82.
- Gallusser, A., Kirchhausen, T. (1993) The Beta 1 And Beta 2 Subunits Of The Ap Complexes Are The Clathrin Coat Assembly Components. *Embo J.* 12(13):5237-44.
- Gao, H., Frost, M.R., Siegwart, J.T. Jr., Norton, T.T. (2011) Patterns Of Mrna And Protein Expression During Minus-Lens Compensation And Recovery In Tree Shrew Sclera. *Mol Vis* 17:903-919.
- Garcla De La Cera, E., RodrlGuez, G., Marcos, S. (2006) Longitudinal Changes Of Optical Aberrations In Normal And Form-Deprived Myopic Chick Eyes. *Vision Res* 46(4) 579-589.
- Gentle, A., Truong, H.T., Mcbrien, N.A. (2001) Glycosaminoglycan Synthesis In The Separate Layers Of The Chick Sclera During Myopic Eye Growth: Comparison With Mammals *Curr. Eye Res* 23, 179–184.
- Gerbe, F., Cox, B., Rossant, J., Chazaud, C. (2008) Dynamic Expression Of Lrp2 Pathway Members Reveals Progressive Epithelial Differentiation Of Primitive Endoderm In Mouse Blastocyst. *Dev Biol* 313(2):594-602.
- Geumann, U., Barysch, S.V., Hoopmann, P., Jahn, R., Rizzoli, S.O. (2008) Snare Function Is Not Involved In Early Endosome Docking. *Mol Biol Cell.* 19(12):5327-37.
- Gilmartin B., Hogan, R.E. (1985) The Relationship Between Tonic Accommodation And Ciliary Muscle Innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26(7):1024-8.
- Gilmartin, B. (2004) Myopia: Precedents For Research In The Twenty-First Century. *Clin Experiment Ophthalmol* 32: (3): 305-324.
- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J.G., Young, S.R., Favor, J., Maas, R.L. (1994) Pax6 Gene Dosage Effect In A Family With Congenital Cataracts, Aniridia, Anophthalmia And Central Nervous System Defects. *Nat. Genet.* 7, 463–471.
- Gliemann, J., Nykjaer, A., Petersen, C.M., Jørgensen, K.E., Nielsen, M., Andreasen, P.A., Christensen, E.I., Lookene, A., Olivecrona, G., Moestrup, S.K. (1994) The Multiligand Alpha 2-Macroglobulin Receptor/Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (Alpha 2Mr/Lrp). Binding And Endocytosis Of Fluid Phase And Membrane Associated Ligands. *Ann N Y Acad Sci* 737:20-38.
- Goh, W.S., Lam, C.S. (1994) Changes In Refractive Trends And Optical Components Of Hong Kong Chinese Aged 19-39 Years. *Ophthalmic Physiol Opt* 14: (4): 378-382.

- Goldschmidt, E. (1968) On The Etiology Of Myopia. An Epidemiological Study. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1(Suppl):11–172.
- González-Villalobos, R., Klassen, R.B., Allen, P.L., Navar, L.G., Hammond, T.G. (2005) Megalin Binds And Internalizes Angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F420-427.
- González-Villalobos, R., Klassen, R.B., Allen, P.L., Johanson, K., Baker, C.B., Kobori, H., Navar, L.G., Hammond, T.G. (2006) Megalin Binds And Internalizes Angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1270-1275.
- Goss, D.A., Jackson, T.W. (1996) Clinical Findings Before The Onset Of Myopia In Youth: 4. Parental History Of Myopia. *Optom Vis Sci*. 73:279–282.
- Goss, D.A., Hampton, M.J., Wickham, M.G. (1988) Selected Review On Genetic Factors In Myopia. *J Am Optom Assoc*. 1988; 59:875–884.
- Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J., Herz, J. (2000) Interactions Of The Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family With Cytosolic Adaptor And Scaffold Proteins Suggest Diverse Biological Functions In Cellular Communication And Signal Transduction. *J Biol Chem*. 275(33):25616-24.
- Gray, M.P., Smith, R.S., Soules, K.A., John, S.W., Link, B.A. (2009) The Aqueous Humor Outflow Pathway Of Zebrafish. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50(4):1515-21.
- Gregory-Evans, C.Y., Williams, M.J., Halford, S., Gregory-Evans, K. (2004) Ocular Coloboma: A Reassessment In The Age Of Molecular Neuroscience. *J Med Genet*. 41(12):881-91.
- Guggenheim, J.A., Northstone, K., McMahon, G., Ness, A.R., Deere, K., Mattocks, C., St Pourcain, B., Williams, C. (2012) Time Outdoors And Physical Activity As Predictors Of Incident Myopia In Childhood: A Prospective Cohort Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Günther, W., Lüchow A., Cluzeaud F., Vandewalle, A., Jentsch, T. (1998) CLC5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8075–8080.
- Guo, H., Tong, P., Peng, Y., Wang, T., Liu, Y., Chen, J., Et Al. (2013) Homo-Zygous Loss-Of-Function Mutation Of The *Leprel1* Gene Causes severe Non-Syndromic High Myopia With Early-Onset Cataract. *Clin Genet*.
- Guo, X., Xiao, X., Li, S., Wang, P., Jia, X., Zhang, Q. (2010) Nonsyndromic high Myopia In A Chinese Family Mapped To *Myp1*: Linkage confirmation And Phenotypic Characterization. *Arch Ophthalmol* 128:1473–9.

H

- Hagemann, A.I., Kurz, J., Kauffeld, S., Chen, Q., Reeves, P.M., Weber, S., Schindler, S., Davidson, G., Kirchhausen, T., Scholpp, S. (2014) In Vivo Analysis Of Formation And Endocytosis Of The Wnt/B-Catenin Signaling Complex In Zebrafish Embryos. *J Cell Sci*. 127(Pt 18):3970-82.
- Hama, H., Saito, A., Takeda, T., Tanuma, A., Xie, Y., Sato, K., Kazama, J.J., Gejyo, F. (2004) Evidence Indicating That Renal Tubular Metabolism Of Leptin Is Mediated By Megalin But Not By The Leptin Receptors. *Endocrinology* 145: 3935-3940.
- Hammad, S.M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W.O., Argraves, W.S. (1997) Interaction Of Apolipoprotein J-Amyloid Beta-Peptide Complex With Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-2/Megalin. A Mechanism To Prevent Pathological Accumulation Of Amyloid Beta-Peptide. *J Biol Chem* 272(30):18644-9.

- Hammad, S.M., Barth, J.L., Knaak, C., Argraves, W.S. (2000) Megalin Acts In Concert With Cubilin To Mediate Endocytosis Of High Density Lipoproteins. *J Biol Chem* 275: 12003-12008
- Hammond, C.J., Snieder, H., Gilbert, C.E., Spector, T.D. (2001) Genes And Environment In Refractive Error: The Twin Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:1232-1236.
- Hammond, C.J., Andrew, T., Mak, Y.T., Spector, T.D. (2004) A Susceptibility Locus For Myopia In The Normal Population Is Linked To The pax6 Gene Region On Chromosome 11: A Genomewide Scan Of Dizygotic Twins. *Am J Hum Genet* 75:294—304.
- Harrison, O.J., Vendome, J., Brasch, J., Jin, X., Hong, S., Katsamba, P.S., Ahlsen, G., Troyanovsky, R.B., Troyanovsky, S.M., Honig, B., Et Al. (2012) Nectin Ectodomain Structures Reveal A Canonical Adhesive Interface. *Nat Struct Mol Biol* 19:906-15
- Hatini, V., Tao, W., And Lai, E. (1994) Expression Of Winged Helix Genes, Bf-1 And Bf-2, Defines Adjacent Domains Within The Developing Forebrain And Retina. *J. Neurobiol.* 25, 1293–1309.
- Hawthorne, F.A., Young, T.L. (2013) Genetic Contributions To Myopic Refractive Error: Insights From Human Studies And Supporting Evidence From Animal Models. *Exp. Eye Res.* 114:141–149.
- He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H.H., Cohen, J.C. (2002) Arh Is A Modular Adaptor Protein That Interacts With The Ldl Receptor, Clathrin, And Ap-2. *J Biol Chem.* 277(46):44044-9.
- HÉBert, J.M., And McConnell, Susan K. (2000) Targeting Of Cre To The Foxg1 (Bf-1) Locus Mediates Loxp Recombination In The Telencephalon And Other Developing Head Structures. *Developmental Biology* 222, 296–306.
- Heldwein, E.E., Macia, E., Wang, J., Yin, H.L., Kirchhausen, T., Harrison, S.C. (2004) Crystal Structure Of The Clathrin Adaptor Protein 1 Core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39):14108-13.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., Herz, J. (1999) Direct Binding Of Reelin To Vldl Receptor And Apoe Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation Of Disabled-1 And Modulates Tau Phosphorylation. *Neuron* 24(2):481-9.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., Van Heyningen, V. (1991) Mouse Small Eye Results From Mutations In A Paired-Like Homeobox-Containing Gene. *Nature* 354, 522-525
- Hinrichsen, L., Harborth, J., Andrees, L., Weber, K., Ungewickell, E.J. (2003) Effect Of Clathrin Heavy Chain- And Alpha-Adaptin-Specific Small Inhibitory RNAs On Endocytic Accessory Proteins And Receptor Trafficking In Hela Cells. *J Biol Chem* 278(46) 45160-70.
- Hjältn, G., Murray, E., Crumley, G., Harazim, W., Lundgren, S., Onyango, I., Ek, B., Larsson, M., Juhlin, C., Hellman, P., Davis, H., Akerström, G., Rask, L., Morse, B. (1996) Cloning And Sequencing Of Human Gp330, A Ca(2+)-Binding Receptor With Potential Intracellular Signaling Properties. *Eur J Biochem* 239(1):132-7.
- Hogan, B.L., Hirst, E.M., Horsburgh, G., Hetherington, C.M., (1988) Small Eye (Sey): A Mouse Model For The Genetic Analysis Of Craniofacial Abnormalities. *Development* 103, 115–119.
- Hogan, B.L. (1996) Bone Morphogenetic Proteins In Development. *Curr Opin Genet Dev.* 6(4):432-8. Review.
- Holekamp, N.M. (2010) The Vitreous Gel: More Than Meets The Eye. *Am. J. Ophthalmol.* 149(1):32– 36.

- Hong, S., Troyanovsky, R.B., Troyanovsky, S.M. (2010) Spontaneous Assembly And Active Disassembly Balance Adherens Junction Homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3528-33.
- Hoshino, T., Sakisaka, T., Baba, T., Yamada, T., Kimura, T., Takai, Y. (2005) Regulation Of E-Cadherin Endocytosis By Nectin Through Afadin, Rap1, And P120Ctn. *J Biol Chem* 280(25):24095-103.
- Howell, B.W., Herrick, T.M., Cooper, J.A. (1999) Reelin-Induced Tyrosine Phosphorylation Of Disabled 1 During Neuronal Positioning. *Genes Dev* 13, 643–648.
- Howlett, M.H., Mcfadden, S.A. (2007) Emmetropization And Schematic Eye Models In Developing Pigmented Guinea Pigs. *Vision Res* 47(9):1178-1190.
- Howlett, M.H., Mcfadden, S.A. (2009) Spectacle Lens Compensation In The Pigmented Guinea Pig. *Vision Res* 49(2):219-227
- Huang, K.M., Gullberg, L., Nelson, K.K., Stefan, C.J., Blumer, K., Lemmon, S.K. (1997) Novel Functions Of Clathrin Light Chains: Clathrin Heavy Chain Trimerization Is Defective In Light Chain-Deficient Yeast. *J Cell Sci.* 110 (Pt 7):899-910.
- Huang, Y., Magdaleno, S., Hopkins, R., Slaughter, C., Curran, T., Keshvara, L. (2004) Tyrosine Phosphorylated Disabled 1 Recruits Crk Family Adapter Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 204–212.
- Huang, M., Anand, S., Murphy, E.A., Desgrosellier, J.S., Stupack, D.G., Shattil, S.J., Schlaepfer, D.D., Cheresch, D.A. (2012) Egfr-Dependent Pancreatic Carcinoma Cell Metastasis Through Rap1 Activation. *Oncogene.* 31(22):2783-93.
- Huser, S., Suri, G., Crottet, P., Spiess, M. (2013) Interaction Of Amphiphysins With Ap-1 Clathrin Adaptors At The Membrane. *Biochem J.* 450(1):73-83.
- Hussain, M.M, Strickland, D.K., Bakillah, A. (1999) The Mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family. *Annu Rev Nutr* 19:141-72.
- Hysi, P.G., Young, T.L., Mackey, D.A., Andrew, T., Fernandez-Medarde, A., Solouki, A.M., Et Al. (2010) A Genome-Wide Association Study For Myopia And Refractive Error Identifies A Susceptibility Locus At15Q25. *Nat Genet* 42:902—5.

I

- Inagaki, M., Irie, K., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Morimoto, K., Inoue, E., Ohtsuka, T., Miyoshi, J., Takai, Y. (2005) Roles of cell-adhesion molecules nectin 1 and nectin 3 in ciliary body development. *Development.* 132(7):1525-37.
- Indra, I., Hong, S., Troyanovsky, R., Kormos, B., Troyanovsky, S. (2013) The adherens junction: a mosaic of cadherin and nectin clusters bundled by actin filaments. *J Invest Dermatol* 133:2546- 54.
- Indra, I., Troyanovsky, R., Troyanovsky, S.M. (2014) Afadin controls cadherin cluster stability using clathrin-independent mechanism. *Tissue Barriers.* 2:e28687.
- Ip & coll. (2008) Role of near work in myopia: findings in a sample of Australian school children. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2903–2910.
- Ip, J.M., Rose, K.A., Morgan, I.G., Burlutsky, G., Mitchell, P. (2008) Myopia and the urban environment: findings in a sample of 12-year-old Australian school children. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3858—63.

J

- Jacobi, F.K., Zrenner, E., Broghammer, M., et al. (2005) A genetic perspective on myopia. *Cell Mol Life Sci* 62: (7-8): 800-808.
- Jahn, R., Lang, T., Südhof, T.C. (2003) Membrane fusion. *Cell.* 112(4):519-33. Review.

- Jen, A., Parkyn, C.J., Mootoosamy, R.C., Ford, M.J., Warley, A., Liu, Q., Bu, G., Baskakov, I.V., Moestrup, S., McGuinness, L., Emptage, N., Morris, R.J. (2010) Neuronal low density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils via receptor cluster 4. *J Cell Sci.* 123(Pt 2):246-55.
- Jensen, L.L., Andersen, R.K., Hager, H., Madsen, M. (2014) Lack of megalin expression in adult human terminal ileum suggests megalin-independent cubilin/amnionless activity during vitamin B12 absorption. *Physiol Rep.* 2(7).
- Jin, A.J., Nossal, R. (1993) Topological mechanisms involved in the formation of clathrin coated vesicles. *Biophys J.* 65(4):1523-37.
- Jones-Jordan, L.A., Mitchell, G.L., Cotter, S.A., Kleinstein, R.N., Manny, R.E., Mutti, D.O., et al. (2011) Visual activity before and after the onset of juvenile myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1841—50.

K

- Kalantry, S., Manning, S., Haub, O., Tomihara-Newberger, C., Lee, H.G., Fangman, J., Distecche, C.M., Manova, K., Lacy, E. (2001) The Amnionless Gene, Essential For Mouse Gastrulation, Encodes A Visceral-Endoderm Specific Protein With An Extracellular Cysteine-Rich Domain. *Nat Genet* 27: 412–416
- Kamatani, Y., Matsuda, K., Okada, Y., Kubo, M., Hosono, N., Et Al. (2010) Genome-Wide Association Study Of Hematological And Biochemical Traits In A Japanese Population. *Nat Genet* 42: 210–215
- Kantarci, S., Al-Gazali, L., Hill, R.S., Donnai, D., Black, G.C., Bieth, E., Chassaing, N., Lacombe, D., Devriendt, K., Teebi, A., Loscertales, M., Robson, C., Liu, T., MacLaughlin, D.T., Noonan, K.M., Russell, M.K., Walsh, C.A., Donahoe, P.K., Pober, B.R. (2007) Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet* 39(8):957-9.
- Kaplan E, & Shapley RM. (1986) The primate retina contains two types of ganglion cells, with high and low contrast sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(8):2755-7.
- Kempen, J.H., Mitchell, P., Lee, K.E., et al. (2004) The prevalence of refractive errors among adults in the United States, Western Europe, and Australia. *Arch Ophthalmol* 122: (4): 495-505.
- Kerjaschki, D., & Farquhar, M.G. (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(18):5557-61.
- Kerjaschki, D., & Farquhar, M.G. (1983) Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 157(2):667-86.
- Kerjaschki, D., Noronha-Blob, L., Sacktor, B., Farquhar, M.G. (1984) Microdomains of distinctive glycoprotein composition in the kidney proximal tubule brush border. *J Cell Biol* 98(4):1505-13.
- Kessel R.G., & Kardon, R.H. (1979) The shape, polarization, and innervation of sensory hair cells in the guinea pig crista ampullaris and macula utriculi. *Scan Electron Microsc* (3) 967-74, 962.
- Keyser, J., Lörger, M., Pavlovic, J., Radziwill, G., Moelling, K. (2007) Role of AF6 protein in cell-to-cell spread of Herpes simplex virus 1. *FEBS Lett* 581:5349-54.
- Khalifa, O., Imtiaz, F., Allam, R., Al-Hassnan, Z., Al-Hemidan, A., Al-Mane, K., Abuharb, G., Balobaid, A., Sakati, N., Hyland, J., Al-Owain, M. (2012) A recessive form of Marshall syndrome is caused by a mutation in the COL11A1 gene. *J Med Genet* 49:246–248.

- Kibbey, R.G., Rizo, J., Gierasch, L.M., Anderson, R.G. (1998) The Ldl Receptor Clustering Motif Interacts With The Clathrin Terminal Domain In A Reverse Turn Conformation. *J Cell Biol.* 142(1):59-67.
- Kiefer, A.K., Tung, J.Y., Do, C.B., Hinds, D.A., Mountain, J.L., Francke, U., Eriksson, N. (2013) Genome-wide analysis points to roles for extracellular matrix remodeling, the visual cycle, and neuronal development in myopia. *PLoS Genet.* 9(2):e1003299.
- Kirby, A.W., Sutton, L., Weiss, H. (1982) Elongation of cat eyes following neonatal lid suture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22(2):274-277.
- Kirschner, N., Houdek, P., Fromm, M., Moll, I., Brandner J.M. (2010) Tight Junctions Form A Barrier In Human Epidermis. *Eur J Cell Biol.* 89(11):839-42.
- Klug, W., Dietl, A., Simon, B., Sinning, I., Wild, K. (2011) Phosphorylation of LRP1 regulates the interaction with Fe65. *FEBS Lett* 585(20):3229-35.
- Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L., Cuenca, N. (2002) A new look at calretinin immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J Comp Neurol* 453(2): 168-84.
- Konig, O., Ruttiger, L., Muller, M., Zimmermann, U., Erdmann, B., Kalbacher, H., Gross, M., Knipper, M (2008) Estrogen And The Inner Ear: Megalin Knockout Mice Suffer Progressive Hearing Loss. *Faseb J* 22: 410-417.
- Korenberg, J.R., Argraves, K.M., Chen, X.N., Tran, H., Strickland, D.K., Argraves, W.S (1994) Chromosomal localization of human genes for the LDL receptor family member glycoprotein 330 (LRP2) and its associated protein RAP (LRPAP1). *Genomics* 22(1) 88-93.
- Kornilova, E.S. (2014) Receptor-Mediated Endocytosis And Cytoskeleton. *Biochemistry (Mosc)* 79(9):865-78.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K., Ogura, T. (2000) Tbx5 and the retinotectum projection. *Science* 287, 134–137.
- Kounnas, M.Z., Morris, R.E., Thompson, M.R., FitzGerald, D.J., Strickland, D.K., Saelinger, C.B. (1992) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* 267(18):12420-3.
- Kounnas, M.Z., Loukinova, E.B., Stefansson, S., Harmony, J.A., Brewer, B.H., Strickland, D.K., Argraves, W.S. (1995) Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *J Biol Chem* 270(22): 13070-5.
- Kozyraki, R., & Cases, O. (2013) Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie.* 2013 May;95(5):1002-7.
- Krantz, K.C., Puchalla, J., Thapa, R., Kobayashi, C., Bisher, M., Viehweg, J., Carr, C.M., Rye H.S. (2013) Clathrin Coat Disassembly By The Yeast Hsc70/Ssa1P And Auxilin/Swa2P Proteins Observed By Single-Particle Burst Analysis Spectroscopy. *J Biol Chem.* 288(37):26721-30.
- Krieger, M., & Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63:601-37.
- Krummenacher, C., Baribaud, I., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. (2003) Cellular localization of nectin-1 and glycoprotein D during herpes simplex virus infection. *J Virol* 77:8985-99.

L

- Laatsch, A., Panteli, M., Sornsakrin, M., Hoffzimmer, B., Grewal, T., Heeren, J. (2012) Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Dependent Endosomal Trapping And Recycling Of Apolipoprotein E. *Plos One*. 7(1):E29385.
- Lai, T.Y.Y., Fan, D.S.P., Lai, W.W.K., Lam, D.S.C. (2008) Peripheral And Posterior Pole Retinal Lesions In Association With High Myopia: A Cross-Sectional Community Based Study In Hong Kong. *Eye Lond. Engl.* 22(2):209–213.
- Lambrecht, H.G., & Koch K.W. (1991) Phosphorylation Of Recoverin, The Calcium-Sensitive Activator Of Photoreceptor Guanylyl Cyclase. *Febs Lett* 294(3):207-9.
- Langlois, B., Perrot, G., Schneider, C., Henriët, P., Emonard, H., Martiny, L., Dedieu, S (2010) Lrp-1 Promotes Cancer Cell Invasion By Supporting Erk And Inhibiting Jnk Signaling Pathways. *Plos One*. 5(7):E11584.
- Lapierre, L.A., Ducharme, N.A., Drake, K.R., Goldenring, J.R., Kenworthy, A.K. (2012) Coordinated Regulation Of Caveolin-1 And Rab11A In Apical Recycling Compartments Of Polarized Epithelial Cells. *Exp Cell Res.* 318(2):103-13.
- Lawrence, M.S, Azar, D.T. (2002) Myopia And Models And Mechanisms Of Refractive Error Control. *Ophthalmol Clin North Am.* 15(1):127-33.
- Lee, J.H., Jee, D., Kwon, J.W., Lee, W.K. (2013) Prevalence And Risk Factors For Myopia In A Rural Korean Population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(8):5466-71.
- Leheste, J.R., Rolinski, B., Vorum, H., Hilpert, J., Nykjaer, A., Jacobsen, C., Aucouturier, P., Moskaug, J.O., Otto, A., Christensen, E.I., Willnow, T.E, (1999) Megalin Knockout Mice As An Animal Model Of Low Molecular Weight Proteinuria. *Am J Pathol* 155: 1361-1370.
- Leheste, J.R., Melsen, F., Wellner, M., Jansen, P., Schlichting, U., Renner-Muller, I., Andreassen, T.T., Wolf, E., Bachmann, S., Nykjaer, A., Willnow, T.E. (2003) Hypocalcemia And Osteopathy In Mice With Kidney-Specific Megalin Gene Defect. *Faseb J* 17: 247-249.
- Leung, K.H., Yiu, W.C., Yap, M.K., Ng, P.W., Fung, W.Y., Sham, P.C., Yip, S.P. (2011) Systematic Investigation Of The Relationship Between High Myopia And Polymorphisms Of The Mmp2, Timp2, And Timp3 Genes By A Dna Pooling Approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(6):3893-900.
- Li, H.H., Li, J., Wasserloos, K.J., Wallace, C., Sullivan, M.G., Bauer, P.M., Stolz, D.B., Lee, J.S., Watkins, S.C., St Croix, C.M., Pitt, B.R., Zhang, L.M. (2013) Caveolae-Dependent And -Independent Uptake Of Albumin In Cultured Rodent Pulmonary Endothelial Cells. *Plos One* 8(11):E81903.
- Li, Y.J., Goh, L., Khor, C.C., Fan, Q., Yu, M., Han, S., Et Al. (2011) Genome-Wide Association Studies Reveal Genetic Variants Inctnd2 For High Myopia In Singapore Chinese. *Ophthalmology* 118:368—75.
- Liem, K. F., Jr, Tremml, G., Roelink, H. And Jessell, T. M. (1995). Dorsal Differentiation Of Neural Plate Cells Induced By Bmp-Mediated Signals From Epidermal Ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Lin, H.C., Moore, M.S., Sanan, D.A., Anderson, R.G. (1991) Reconstitution Of Clathrin-Coated Pit Budding From Plasma Membranes. *J Cell Biol.* 114(5):881-91.
- Lin, L.L., Hung, P.T., Ko, L.S., Hou, P.K. (1988) Study Of Myopia Among Aboriginal School Children In Taiwan. *Acta Ophthalmol Suppl.* 185:34–36.
- Lin, L.L., Shih, Y.F., Hsiao, C.K., Chen, C.J. (2004) Prevalence Of Myopia In Tai-Wanese Schoolchildren: 1983 To 2000. *Ann Acad Med Singapore* 33:27—33.
- Liu, C.C., Kanekiyo, T., Roth, B., Bu, G. (2014) Tyrosine-Based Signal Mediates Lrp6 Receptor Endocytosis And Desensitization Of Wnt/B-Catenin Pathway Signaling. *J Biol Chem.* 289(40):27562-70.

- Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S.F., Graham, T.R. (2008) P4-ATPase Requirement For Ap-1/Clathrin Function In Protein Transport From The Trans-Golgi Network And Early Endosomes. *Mol Biol Cell*. 19(8):3526-35.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Fisher, S.E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman S.J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S.P., Wrong, O., Jentsch, T.J., Craig, I.W., Thakker, R.V. (1996) A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature (Lond)* 379: 445–449.
- Lopes, M.C., Andrew, T., Carbonaro, F., Spector, T.D., Hammond, C.J. (2009) Estimating Heritability And Shared Environmental Effects Forrefractive Error In Twin And Family Studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:126—31.
- Lowe, C., Terrey, M., MacLachlan, E. (1952) Organic aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos and mental retardation: A clinical entity. *Am J Dis Child* 83: 164–184.
- Lu, F., Zhou, X., Zhao, H. Et Al. (2006) Axial Myopia Induced By A Monocularly-Deprived Facemask In Guinea Pigs: A Non-Invasive And Effective Model. *Exp Eye Res* 82 (4): 628-636
- Lundgren, S., Carling, T., Hjälml, G., Juhlin, C., Rastad, J., Pihlgren, U., Rask, L., Akerström, G., Hellman, P. (1997) Tissue Distribution Of Human Gp330/Megalin, A Putative Ca(2+)-Sensing Protein. *J Histochem Cytochem* 45(3):383-92.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., Karsenty, G. (1995) Bmp-7 Is An Inducer Of Nephrogenesis, And Is Also Required For Eye Development And Skeletal Patterning. *Genes Dev*. 9, 2808–2820.
- Lyhne, N., Sjolie, A.K., Kyvik, K.O., Green, A. (2001) The Importance Of Genes And Environment For Ocular Refraction And Its Determiners: A Population Based Study Among 20–45 Year Old Twins. *Br J Ophthalmol*. 85:1470–1476.

M

- Majeed, S.R., Vasudevan, L., Chen, C.Y., Luo, Y., Torres, J.A., Evans, T.M., Sharkey, A., Foraker, A.B., Wong, N.M., Esk, C., Freeman, T.A., Moffett, A., Keen, J.H., Brodsky, F.M. (2014) Clathrin light chains are required for the gyrating-clathrin recycling pathway and thereby promote cell migration. *Nat Commun*. 5:3891.
- Martínez-Hernández, M.G., Baiza-Gutman, L.A., Castillo-Trápala, A., Armant, D.R. (2011) Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9. *Reproduction* 141(2):227-39.
- Marzolo, M.P., Yuseff, M.I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfán, P., Li, Y., Bu, G (2003) Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic* 4(4) 273-88.
- Marzolo, M.P., & Farfán, P. (2011) New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biol Res* 44(1):89-105.
- Matsuoka, R.L., Sun, L.O., Katayama, K., Yoshida, Y., Kolodkin, A.L. (2013) Sema6B, Sema6C, and Sema6D expression and function during mammalian retinal development. *PLoS One* 8(4):e63207.
- Mayor, S., Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(8):603-12.
- McCarthy, R.A., Barth, J.L., Chintalapudi, M.R., Knaak, C., Argraves, W.S. (2002) Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *J. Biol. Chem*. 277, 25660-25667.

- McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M., Smythe, E. (1998) A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol.* 8(1) 34-45.
- McLaughlin, C.W., Peart, D., Purves, R.D., Carré, D.A., Macknight, A.D., Civan, M.M. (1998) Effects of HCO₃⁻ on cell composition of rabbit ciliary epithelium: a new model for aqueous humor secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(9):1631-41.
- Meng, W., Butterworth, J., Malecaze, F., Calvas, P. (2010) Axial length: an underestimated endophenotype of myopia. *Med Hypotheses.* 74(2):252-3.
- Mercer, A.J., & Thoreson, W.B. (2011) The dynamic architecture of photoreceptor ribbon synapses: cytoskeletal, extracellular matrix, and intramembrane proteins. *Vis Neurosci* 28(6):453-71.
- Mii, A., Nakajima, T., Fujita, Y., Iino, Y., Kamimura, K., et al. (2007) Genetic association of low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2) with plasma lipid levels. *J Atheroscler Thromb* 14: 310–316.
- Mills, I.G., Jones, A.T., Clague M.J. (1998) Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr Biol.* 8(15):881-4.
- Mishra, S.K., Keyel, P.A., Hawryluk, M.J., Agostinelli, N.R., Watkins, S.C., Traub, L.M. (2002) Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *EMBO J.* 21(18):4915-26.
- Mitry, D., & Zambarakji, H. (2012) Recent trends in the management of maculopathy secondary to pathological myopia. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol. 250(1):3–13.
- Miyahara, M., Nakanishi, H., Takahashi, K., Satoh- Horikawa, K., Tachibana, K., Takai, Y. (2000) Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction. *J Biol Chem* 275:613- 8.
- Mizuta, K., Saito, A., Watanabe, T., Nagura, M., Arakawa, M., Shimizu, F., Hoshino, T. (1999) Ultrastructural localization of megalin in the rat cochlear duct. *Hear Res* 129: 83-91
- Moestrup, S.K., Nielsen, S., Andreasen, P., Jørgensen, K.E., Nykjaer, A., Røigaard, H., Gliemann, J., Christensen, E.I. (1993) Epithelial glycoprotein-330 mediates endocytosis of plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor type-1 complexes. *J Biol Chem* 268(22):16564-70.
- Moestrup, S.K. (1994) The alpha 2-macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330: two giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands. *Biochim Biophys Acta* 1197(2):197-213.
- Molfetta, R., Quatrini, L., Gasparrini, F., Zitti, B., Santoni, A., Paolini, R. (2014) Regulation of fc receptor endocytic trafficking by ubiquitination. *Front Immunol.* 5:449.
- Morales, C.R., Igdoura, S.A., Wosu, U.A., Boman, J., Argraves, W.S. (1996) Low density lipoprotein receptor-related protein-2 expression in efferent duct and epididymal epithelia: evidence in rats for its in vivo role in endocytosis of apolipoprotein J/ clusterin. *Biol Reprod* 55: 676-683.
- Mordechai, S., Gradstein, L., Pasanen, A., Ofir, R., El Amour, K., Levy, J., et al. (2011) High myopia caused by a mutation in LEPREL1, encoding prolyl 3-hydroxylase 2. *Am J Hum Genet* 89:438—45.
- Morgan, I., & Rose, K. (2005) How genetic is school myopia? *Prog Retin Eye Res* 24:1-38.
- Morgan, I.G., & Rose, K.A. (2013) Myopia and international educational performance. *Ophthalmic Physiol Opt* 33:329—38.
- Morgan, I.G., Ohno-Matsui, K., Saw, S.M. (2012) Myopia. *Lancet* 379:1739-48.
- Morgan, I.G., Ashby, R.S., Nickla, D.L. (2013) Form deprivation and lens-induced myopia: are they different?. *Ophthalmic Physiol Opt* 33(3):355-361.

- Morris, S.M., Tallquist, M.D., Rock, C.O., Cooper, J.A. (2002) Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *EMBO J* 21(7) 1555-64.
- Moshkanbaryans, L., Chan, L.S., Graham, M.E. (2014) The Biochemical Properties and Functions of CALM and AP180 in Clathrin Mediated Endocytosis. *Membranes* (Basel). 4(3):388-413.
- Mulkearns, E.E., Cooper, J.A. (2012) FCH domain only-2 organizes clathrin-coated structures and interacts with Disabled-2 for low-density lipoprotein receptor endocytosis. *Mol Biol Cell*. 23(7):1330-42.
- Mutti, D.O., Mitchell, G.L., Jones, L.A. et al. (2005) Axial growth and changes in lenticular and corneal power during emmetropization in infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: (9) 3074-3080.

N

- Naiglin, L., Clayton, J., Gazagne, C., Dallongeville, F., Malecaze, F., Calvas, P. (1999) Familial High Myopia: Evidence Of An Autosomal Dominant Mode Of Inheritance And Genetic Heterogeneity. *Ann Genet*. 42:140–146.
- Nakagawa, A., Takai, Y., Sakisaka, T. (2011) Crystal Structure Of The Cis-Dimer Of Nectin-1: Implications For The Architecture Of Cell- Cell Junctions. *J Biol Chem* 286:12659-69
- Nakayama, A., Nakayama, M., Turner, C.J., Höing, S., Lepore, J.J., Adams, R.H. (2013) Ephrin-B2 Controls Pdgfr β Internalization And Signaling. *Genes Dev*. 27(23): 2576-89.
- Nallasamy, S., Paluru, P.C., Devoto, M., Wasserman, N.F., Zhou, J., Young, T.L. (2007) Genetic Linkage Study Of High-Grade Myopia In A Hutterite Population From South Dakota. *Mol Vis*. 13:229-36.
- Napier, H.R., & Kidson, S.H. (2005) Proliferation And Cell Shape Changes During Ciliary Body Morphogenesis In The Mouse. *Dev Dyn* 233(1):213-23.
- Narita, H., Yamamoto, Y., Suzuki, M., Miyazaki, N., Yoshida, A., Kawai, K., Iwasaki, K., Newman, E., & Reichenbach, A. (1996) The Müller Cell: A Functional Element Of The Retina. *Trends Neurosci* 19(8):307-12.
- Niessen, C.M. (2007) Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure And Function. *J Invest Dermatol*. 127(11):2525-32.
- Nielsen, R., Courtoy, P.J., Jacobsen, C., Dom, G., Lima, W.R., Jadot, M., Willnow, T.E., Devuyst, O., Christensen, E.I (2007) Endocytosis Provides A Major Alternative Pathway For Lysosomal Biogenesis In Kidney Proximal Tubular Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5407-5412
- Norden, A.G., Lapsley, M., Igarashi, T., Kelleher, C.L., Lee, P.J., Matsuyama, T., Scheinman, S.J., Shiraga, H., Sundin, D.P., Thakker, R.V., Unwin, R.J., Verroust, P., Moestrup, S.K. (2002) Urinary Megalin Deficiency Implicates Abnormal Tubular Endocytic Function In Fanconi Syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 13(1):125-33.
- Norton, T.T., Amedo., A.O., Siegwart, J.T., Jr. (2006) Darkness causes myopia in visually experienced tree shrews. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: (11): 4700-4707.

O

- Ockenga, W., Kühne, S., Bocksberger, S., Banning, A., Tikkanen, R. (2014) Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Is Required for Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Muscarinic Acetylcholine Receptors in HaCaT Keratinocytes. *Int J Mol Sci*. 15(11):21433-54.

- Ohkubo, T., Ozawa, M. (1999) p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *J Biol Chem.* 274(30):21409-15.
- Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, U., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y., Zerial, M. (2009) Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature.* 459(7250):1091-7.
- Oleinikov, A.V., Zhao, J., Makker, S.P. (2000) Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem J* 347 Pt 3:613-21.
- Ooshio, T., Kobayashi, R., Ikeda, W., Miyata, M., Fukumoto, Y., Matsuzawa, N., Ogita, H., Takai, Y. (2010) Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 285:5003-12
- Orlando, R.A., Farquhar, M.G. (1993) Identification of a cell line that expresses a cell surface and a soluble form of the gp330/receptor-associated protein (RAP) Heymann nephritis antigenic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9):4082-6.
- Orlando, R.A., Rader, K., Authier, F., Yamazaki, H., Posner, B.I., Bergeron, J.J., Farquhar, M.G. (1998) Megalin Is An Endocytic Receptor For Insulin. *J Am Soc Nephrol* 9: 1759-1766
- Ouyang, P-B., Duan, X-C., Zhu, X-H. (2012) Diagnosis and treatment of myopic traction maculopathy. *Int. J. Ophthalmol.* 2012;5(6):754–758.
- Owen, D.J., Collins, B.M., Evans, P.R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:153-91.

P

- Pacella, R., McLellan, J., Grice, K., Del Bono, E.A., Wiggs, J.L., Gwiazda, J.E. (1999) Role of genetic factors in the etiology of juvenile-onset myopia based on a longitudinal study of refractive error. *Optom Vis Sci.* 76:381–386.
- Paluru, P., Ronan, S.M., Heon, E., Devoto, M., Wildenberg, S.C., Scavella, G., Holleschau, A., Mäkitie, O., Cole, W.G., King, R.A., Young, T.L. (2003) New locus for autosomal dominant high myopia maps to the long arm of chromosome 17. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(5):1830-6.
- Pardue, M.T., Stone, R.A., Luvone, P.M. (2013) Investigating mechanisms of myopia in mice. *Exp Eye Res.* 114:96-105.
- Park, S.Y., Guo, X. (2014) Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep.* 34(4).
- Patel, N., Hejkal, T., Katz, A., Margalit, E. (2007) Ocular manifestations of Donnai-Barrow syndrome. *J Child Neurol* 22: 462–464.
- Perkins, E.S. (1984) Cataract: refractive error, diabetes, and morphology. *Br J Ophthalmol.* 68(5):293-7.
- Perry, V.H., & Walker, M. (1980) Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 208(1173): 415-31.
- Pfeffer, S. (2003) Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell.* 112(4):507-17. Review.
- Pickett-Seltner, R.L., Sivak, J.G., Pasternak, J.J. (1988) Experimentally induced myopia in chicks: Morphometric and biochemical analysis during the first 14 days after hatching. *Vision Res* 28, 323-328.
- Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M., Jentsch, T. (2000) CLC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature (Lond)* 408: 369–373.

- Pober, B.R., Longoni, M., Noonan, K.M. (2009) A review of Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal (DB/FOAR) syndrome: clinical features and differential diagnosis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85: 76–81.
- Pokutta, S., Drees, F., Takai, Y., Nelson, W.J., Weis, W.I. (2002) Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem* 277:18868-74
- Puller, C., Haverkamp, S., Neitz, M., Neitz, J. (2014) Synaptic elements for GABAergic feed-forward signaling between HII horizontal cells and blue cone bipolar cells are enriched beneath primate S-cones. *PLoS One* 2014 9(2):e88963.

Q

- Quinn, J.C., West, J.D., Hill, R.E. (1996) Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development. *Genes Dev.* 10, 435–446.

R

- Rabin, J., Van Sluyters, R.C., Malach, R. (1981) Emmetropization: a vision-dependent phenomenon. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20(4):561-4.
- Rada, J. A., Thoft, R. A., Hassell, J. R. (1991) Increased aggrecan (cartilage proteoglycan) production in the sclera of myopic chicks. *Dev. Biol* 147, 303±12.
- Rada J.A., Nickla, D.L., Troilo, D. (2000) Decreased proteoglycan synthesis associated with form deprivation myopia in mature primate eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(8) 2050-2058.
- Rada, J.A., Johnson, J.M., Achen, V.R., Rada, K.G. (2002) Inhibition of scleral proteoglycan synthesis blocks deprivation-induced axial elongation in chicks. *Exp Eye Res* 74(2):205-215.
- Rada, J.A., Wiechmann, A.F. (2006) Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47(1):25-33.
- Rai, S., Tanaka, H., Suzuki, M., Ogoh, H., Taniguchi, Y., Morita, Y., Shimada, T., Tanimura, A., Matsui, K., Yokota, T., Oritani, K., Tanabe, K., Watanabe, T., Kanakura, Y., Matsumura, I. (2014) Clathrin assembly protein CALM plays a critical role in KIT signaling by regulating its cellular transport from early to late endosomes in hematopoietic cells. *PLoS One.* 9(10):e109441.
- Rainey, M.A., George, M., Ying, G., Akakura, R., Burgess, D.J., Siefker, E., Bargar, T., Doglio, L., Crawford, S.E., Todd, G.L., Govindarajan, V., Hess, R.A., Band, V., Naramura, M., Band, H. (2010) The endocytic recycling regulator EHD1 is essential for spermatogenesis and male fertility in mice. *BMC Dev Biol.* 10:37.
- Ravichandran, K.S., Zhou, M.M., Pratt, J.C., Harlan, J.E., Walk, S.F., Fesik, S.W., Burakoff, S.J. (1997) Evidence for a requirement for both phospholipid and phosphotyrosine binding via the Shc phosphotyrosine-binding domain in vivo. *Mol Cell Biol* 17(9): 5540-9.
- Raviola, E., Wiesel, T.N. (1985) An animal model of myopia. *N Engl J Med.* 312(25): 1609-15.
- Raviola, G. (1971) The fine structure of the ciliary zonule and ciliary epithelium. With special regard to the organization and insertion of the zonular fibrils. *Invest Ophthalmol* 10(11):851-69.
- Raviola, G. (1974) Effects of paracentesis on the blood-aqueous barrier: an electron microscope study on *Macaca mulatta* using horseradish peroxidase as a tracer. *Invest Ophthalmol.* 13(11):828-58.

- Raviola, G., & Raviola, E. (1978) Intercellular junctions in the ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17(10):958-81.
- Raymond, P.A., Hitchcock, P.F., Palopoli, M.F. (1988) Neuronal cell proliferation and ocular enlargement in Black Moor goldfish. *J Comp Neurol* 276: 231–238
- Rein, D.B., Zhang, P., Wirth, K.E., Lee, P.P., Hoerger, T.J., Mccall, N., et al. (2006) The economic burden of major adult visual disorders in the United States. *Arch Ophthalmol* 124:1754—60.
- Richards, A.J., McNinch, A., Martin, H., Oakhill, K., Rai, H., Waller, S., Treacy, B., Whittaker, J., Meredith, S., Poulson, A., and Snead, M.P. (2010) Stickler syndrome and the vitreous phenotype: mutations in COL2A1 and COL11A1. *Hum Mutat* 31(6):E1461-71.
- Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T. (1996) The glaucomas. Basic sciences. St. Louis: Mosby. 126 p.
- Robinson, D.G., & Pimpl, P. (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci* 19(3):134-9.
- Rohrer, B., Tao, J., Stell, W.K. (1997) Basic fibroblast growth factor, its high- and low-affinity receptors, and their relationship to form-deprivation myopia in the chick. *Neuroscience*. 79(3):775-87.
- Rose, K.A., Morgan, I.G., Ip, J., Kifley, A., Huynh, S., Smith, W., et al. (2008) Outdoor activity reduces the prevalence of myopia in children. *Ophthalmology* 115:1279—85.
- Rose et coll. (2008) Outdoor activity reduces the prevalence of myopia in children. *Ophthalmology*. 115: 1279–1285.
- Rosner, M., Belkin, M. Intelligence, education, and myopia in males. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1508–1511.

S

- Sahali, D., Mulliez, N., Chatelet, F., Dupuis, R., Ronco, P., Verroust, P. (1988) Characterization Of A 280-Kd Protein Restricted To The Coated Pits Of The Renal Brush Border And The Epithelial Cells Of The Yolk Sac. Teratogenic Effect Of The Specific Monoclonal Antibodies. *J Exp Med* 167(1):213-8.
- Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A.K., Farquhar, M.G. (1994) Complete Cloning And Sequencing Of Rat Gp330/"Megalin," A Distinctive Member Of The Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21):9725-9.
- Samanta, D., Ramagopal, U.A., Rubinstein, R., Vigdorovich, V., Nathenson, S.G., Almo, S.C. (2012) Structure Of Nectin-2 Reveals Determinants Of Homophilic And Heterophilic Interactions That Control Cell-Cell Adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14836- 40
- Sato, T., Fujita, N., Yamada, A., Ooshio, T., Okamoto, R., Irie, K. Takai, Y. (2006) Regulation Of The Assembly And Adhesion Activity Of E-Cadherin By Nectin And Afadin For The Formation Of Adherens Junctions In Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Biol. Chem* 281, 5288-5299.
- Sawyer, J.K., Harris, N.J., Slep, K.C., Gaul, U., Peifer, M. (2009) The Drosophila Afadin Homologue Canoe Regulates Linkage Of The Actin Cytoskeleton To Adherens Junctions During Apical Constriction. In *J Cell Biol.* Vol. 186. 57-73.
- Schaeffel, F., Howland, H.C. (1988) Mathematical Model Of Emmetropization In The Chicken. *J Opt Soc Am A* 5: (12): 2080-2086.
- Schaeffel, F., Burkhardt, E., Howland, H.C., Et Al. (2004) Measurement Of Refractive State And Deprivation Myopia In Two Strains Of Mice. *Optom Vis Sci* 81: (2): 99-110.

- Schneider, W.J., Nimpf, J., Bujo. (1997) Novel Members Of The Low Density Lipoprotein Receptor Superfamily And Their Potential Roles In Lipide Metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 8(5) 315-9.
- Schrauwen, I., Et Al. (2014) Broadening The Phenotype Of Lrp2 Mutations: A New Mutation In Lrp2 Causes A Predominantly Ocular Phenotype Suggestive Of Stickler Syndrome. *Clin. Genet.* 86(3):282–286.
- Shanske, A., Bogdanow, A., Shprintzen, R.J., Marion, R.W. (1998) Marshall Syndrome And A Defect At The Col11A1 Locus. *Am J Hum Genet* 63:1558–1561.
- Shen, W., Vijayan, M., Sivak, Jg. (2005) Inducing Form-Deprivation Myopia In Fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: (5): 1797-1803.
- Sherwin Et Al. (2012) The Association Between Time Spent Outdoors And Myopia In Children And Adolescents. *Ophthalmology*, 119:2141-2151.
- SHimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puelles, L., And Rubenstein, J. L. (1995) Longitudinal Organization Of The Anterior Neural Plate And Neural Tube. *Development* 121, 3923–3933.
- Shin, B.C., Suzuki, T., Tanaka, S., Kuraoka, A., Shibata, Y., Takata, K. (1996) Connexin 43 And The Glucose Transporter Glut1, In The Ciliary Body Of The Rat. *Histochem Cell Biol.* 106(2):209-14.
- Sholtz, R.I., Adams, A.J. (1994) The Effect Of Parental History Of Myopia On Children's Eye Size. *Jama.* 1994; 271:1323–1327.
- Sieglwart, J.T., Jr., Norton, T.T. (1998) The Susceptible Period For Deprivation-Induced Myopia In Tree Shrew. *Vision Res* 38: (22): 3505-3515.
- Singh, P.K., Shiha, M.J., Kumar, A. (2014) Antibacterial Responses Of Retinal Müller Glia: Production Of Antimicrobial Peptides, Oxidative Burst And Phagocytosis.J *Neuroinflammation.* 11:33. Doi: 10.1186/1742-2094-11-33.
- Slepnev, V.I., Ochoa, G.C., Butler, M.H., De Camilli, P. (2000) Tandem Arrangement Of The Clathrin And Ap-2 Binding Domains In Amphiphysin 1 And Disruption Of Clathrin Coat Function By Amphiphysin Fragments Comprising These Sites. *J Biol Chem.* 275(23):17583-9.
- Smith, E.L. 3Rd., Harwerth, R.S., Crawford, M.L., Von Noorden, G.K. (1987) Observations On The Effects Of Form Deprivation On The Refractive Status Of The Monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28(8):1236-45.
- Smith, E.L. 3Rd., Hung, L.F., Huang, J. (2012) Protective Effects Of High Ambient Lighting On The Development Of Form-Deprivation Myopia In Rhesus Monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(1):421-428.
- Smith R.L., Raviola, G. (1983) The Structural Basis Of The Blood-Aqueous Barrier In The Chicken Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24(3):326-38.
- Smith, R.S., Zabaleta, A., Savinova, O.V., John, S.W. (2001) The Mouse Anterior Chamber Angle And Trabecular Meshwork Develop Without Cell Death. *Bmc Dev Biol.* 2001;1:3.
- Snead, M.P., Payne, S.J., Barton, D.E., Yates, J.R., Al-Imara, L., Pope, F.M., Scott, J.D. (1994) Stickler Syndrome: Correlation Between Vitreoretinal Phenotypes And Linkage To Col 2A1. *Eye (Lond).* 1994;8 (Pt 6):609-14
- Snead, M.P., Yates, J.R., Pope, F.M., Temple, I.K., Scott, J.D. (1996) Masked Confirmation Of Linkage Between Type 1 Congenital Vitreous Anomaly And Col 2A1 In Stickler Syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 234(11):720-1.
- Snead, M.P., Yates, J.R. (1999) Clinical And Molecular Genetics Of Stickler Syndrome. *J Med Genet.* 36(5):353-9.

- Snead, M.P., Mcninch, A.M., Poulson, A.V., Bearcroft, P., Silverman, B., Gomersall, P., Parfect, V., Richards, A.J. (2011) Stickler Syndrome, Ocular-Only Variants And A Key Diagnostic Role For The Ophthalmologist. *Eye (Lond)*. 2011 Nov;25(11) 1389-400.
- Spoelgen, R., Hammes, A., Anzenberger, U., Zechner, D., Andersen, O.M., Et Al. (2005) Lrp2/Megalin Is Required For Patterning Of The Ventral Telencephalon. *Development* 132: 405–414.
- Sorsby, A. Sheridan, M. Leary, G.A. (1962) Refraction And Its Components In Twins. Medical Research Council Special Report. London: Her Majesty's Stationery Office, Medical Research Council.
- Sorsby, A., Leary, G.A., Fraser, G.R. (1966) Family Studies On Ocular Refraction And Its Components. *J Med Genet*. 3:269–273.
- Sorsby, A., Sheridan, M., And Leary, G.A. Refraction And Its Compo-Nents In Twins. Medical Research Council Special Report Series, No3031962, London: Hmso.
- Solouki, A.M., Verhoeven, V.J., Van Duijn, C.M., Verkerk, A.J., Ikram, M.K., Hysi, P.G., Et Al. (2010) A Genome-Wide Association Study Identifies a Susceptibility Locus For Refractive Errors And Myopia At 15Q14. *Nat Genet* 42:897—901.
- Spoelgen, R., Hammes, A., Anzenberger, U., Zechner, D., Andersen, O.M., Jerchow, B., Willnow, T.E. (2005) Lrp2/Megalin Is Required For Patterning Of The Ventral Telencephalon. *Development* 132: 405-414.
- Stockinger, W., Sailer, B., Strasser, V., Recheis, B., Fasching, D., Kahr, L., Schneider, W.J., Nimpf, J. (2002) The Px-Domain Protein Snx17 Interacts With Members Of The Ldl Receptor Family And Modulates Endocytosis Of The Ldl Receptor. *Embo J*. 21(16):4259-67.
- Stolt P.C., Bock, H.H. (2006) Modulation Of Lipoprotein Receptor Functions By Intracellular Adaptor Proteins. *Cell Signal*. 18(10):1560-71.
- Storm, T., Heegaard, S., Christensen, E.I., Nielsen, R. (2014) Megalin-Deficiency Causes High Myopia, Retinal Pigment Epithelium-Macromelanosomes And Abnormal Development Of The Ciliary Body In Mice. *Cell Tissue Res*. 358(1):99–107.
- Streeten, B.W., Licari, P.A. (1983) The Zonules And The Elastic Microfibrillar System In The Ciliary Body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 24(6):667-81.
- Strope, S., Rivi, R., Metzger, T., Manova, K., Lacy, E. (2004) Mouse Amnionless, Which Is Required For Primitive Streak Assembly, Mediates Cell-Surface Localization And Endocytic Function Of Cubilin On Visceral Endoderm And Kidney Proximal Tubules. *Development* 131(19):4787-95. Sahali Et Al., 1988
- Sun, Y., Shestakova, A., Hunt, L., Sehgal, S., Lupashin, V., Storrie, B. (2007) Rab6 Regulates Both Zw10/Rint-1 And Conserved Oligomeric Golgi Complex-Dependent Golgi Trafficking And Homeostasis. *Mol Biol Cell*. 18(10):4129-42.
- Suzuki, R., Toshima, J.Y., Toshima, J. (2012) Regulation Of Clathrin Coat Assembly By Eps15 Homology Domain-Mediated Interactions During Endocytosis. *Mol Biol Cell*. 23(4):687-700.

T

- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., Takai, Y. (1999) Nectin/Prr: An Immunoglobulin-Like Cell Adhesion Molecule Recruited To Cadherin-Based Adherens Junctions Through Interaction With Afadin, A Pdz Domain-Containing Protein. *J Cell Biol*. 145(3):539-49.
- Takai, Y., Nakanishi, H. (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci*. 116(Pt 1):17-27.

- Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W. (2003) Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci.* 94(8): 655-67.
- Takeda, T., Yamazaki, H., Farquhar, M.G. (2003) Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(5):C1105-13.
- Takai, Y., Nakanishi, H. (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci.* 116(Pt 1):17-27.
- Takai, Y., Shimizu, K., Ohtsuka, T. (2003) The roles of cadherins and nectins in interneuronal synapse formation. *Curr Opin Neurobiol.* 13(5):520-6.
- Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., Rikitake, Y. (2008) The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:309-42.
- Tan, P.K., Davis, N.G., Sprague, G.F., Payne, G.S. (1993) Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J Cell Biol.* 123(6 Pt 2):1707-16.
- Tanabe, Y., Jessell, T.M. (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science.* 274(5290):1115-23.
- Tanaka-Okamoto, M., Hori, K., Ishizaki, H., Itoh, Y., Onishi, S., Yonemura, S., Takai, Y., Miyoshi, J. (2011) Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia. *J Cell Sci.* 124(Pt 13):2231-40.
- Tang, W.C., Yip, S.P., Lo, K.K., Ng, P.W., Choi, P.S., Lee, S.Y., Yap, M.K. (2007) Linkage and association of myocilin (MYOC) polymorphisms with high myopia in a Chinese population. *Mol Vis.* 13:534-44.
- Tano, Y. (2002) Pathologic myopia: where are we now?. *Am J Ophthalmol.* 134(5): 645-60.
- Teckchandani, A., Mulkearns, E.E., Randolph, T.W., Toida, N., Cooper, J.A. (2012) The clathrin adaptor Dab2 recruits EH domain scaffold proteins to regulate integrin β 1 endocytosis. *Mol Biol Cell.* 23(15):2905-16.
- Teikari, J., O'Donnell, J.J., Kaprio, J., Koskenvuo, M. (1989) Genetic and environmental effects on oculometric traits. *Optom Vis Sci.* 66:594–599.
- Teikari, J.M., O'Donnell, J., Kaprio, J., Koskenvuo, M. (1991) Impact of heredity in myopia. *Hum Hered.* 41:151–156.
- Tejedor, J, de la Villa, P. (2003) Refractive changes induced by form deprivation in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(1):32-6.
- Thakker, R.V. (2000) Pathogenesis of Dent 's disease and related syndromes of X-linked nephrolithiasis. *Kidney Int* 57: 787–793.
- Thoreson, W.B, & Mangel, S.C. (2012) Lateral interactions in the outer retina. *Prog Retin Eye Res* 31(5):407-41.
- Thorleifsson, G., Walters, G.B., Hewitt, A.W., Masson, G., Helgason, A., et al. (2010) Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 42: 906–909.
- Tian, Y., Cui, J., Zhou, Y. (2009) Clinical analysis of 11 patients with high myopia and angle closure. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 34(8):768-70.
- Tkatchenko, T.V., Shen, Y., Tkatchenko, A.V. (2010) Analysis of Postnatal Eye Development in the Mouse with High-Resolution Small Animal Magnetic Resonance Imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(1):21-7.
- Tokoro, T. (1988) On the definition of pathologic myopia in group studies. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1988;185:107-8.
- Troilo, D., Judge, S.J. (1993) Ocular development and visual deprivation myopia in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vision Res* 33: (10): 1311-1324.

- Troilo, D., Nickla, D. L., Wildsoet, C. F. (2000) Choroidal thickness changes during altered eye growth and refractive state in a primate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1249±58.
- Troilo, D., Nickla, D.L. (2005) The response to visual form deprivation differs with age in marmosets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 6(6):1873-1881.
- Troilo, D., Nickla, D.L., Mertz, J.R., Summers Rada, J.A. (2006) Change in the synthesis rates of ocular retinoic acid and scleral glycosaminoglycan during experimentally altered eye growth in marmosets. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47(5):1768-77.
- Tomas, A., Futter, C.E., Eden, E.R. (2014) EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*. 24(1):26-34.
- Trommsdorff, M., Borg, J.P., Margolis, B., Herz, J. (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273(50):33556-60.
- Troutman, R.C., Meltzer, M. (1972) Astigmatism and myopia in keratoconus. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1972;70:265-77.

V

- Van Camp, G., Snoeckx, R.L., Hilgert, N., Van Den Ende, J., Fukuoka, H., Wagatsuma, M., Suzuki, H., Smets, R.M., Vanhoenacker, F., Declau, F., Van De Heyning, P., Usami, S (2006) A New Autosomal Recessive Form Of Stickler Syndrome Is Caused By A Mutation In The Col9A1 Gene. *Am J Hum Genet* 79:449–457.
- Van Der Bliek, A.M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M., Schmid, S.L. (1993) Mutations In Human Dynamin Block An Intermediate Stage In Coated Vesicle Formation. *J Cell Biol*. 122(3):553-63.
- Verhoeven, V.J., Hysi, P.G., Saw, S.M., Vitart, V., Mirshahi, A., Guggenheim, J.A., Et Al. (2012) Large Scale International Replica-Tion And Meta-Analysis Study Confirms Association Of The15Q14 Locus With Myopia. The Cream Consortium. *Hum Genet* 131:1467—80.
- Verhoeven, V.J., & Buitendijk, G.H., (2013) Consortium For Refractive Errorand, Myopia (Cream), Rivadeneira F, Uitterlinden Ag, Et Al.Education Influences The Role Of Genetics In Myopia. *Eur J Epi-Demiol* 28:973—80.
- Verhoeven, V.J. Et Al. (2013) Genome-Wide Meta-Analyses Of Multiancestry Cohorts Identify Multiple New Susceptibility Loci For Refractive Error And Myopia. *Nat Genet* 45(3):314-8.
- Vera-Diaz F.A, Gwiazda J., Thorn F., Held R. (2004) Increased Accommodation Following Adaptation To Image Blur In Myopes. *J Vis*. 4(12):1111-9.
- Verroust, P.J., Kozyraki, R. (2003) Cubilin: Physiopathologic Role And Relationship With Megalin. *Med Sci (Paris)* 19(3):337-43.
- Vessey, K.A., Rushforth, D.A., Stell, W.K. (2005) Glucagon- And Secretin-Related Peptides Differentially Alter Ocular Growth And The Development Of Form-Deprivation Myopia In Chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46(11):3932-42.
- Veth, K.N. Et Al. (2011) Mutations In Zebrafish Lrp2 Result In Adult-Onset Ocular Pathogenesis That Models Myopia And Other Risk Factors For Glaucoma. *Plos Genet*. 7(2):E1001310.
- Vikkula, M., Mariman, E.C., Lui, V.C., Zhidkova, N.I., Tiller, G.E., Goldring, M.B., Van Beersum, S.E., De Waal Malefijt, M.C., Van Den Hoogen, F.H., Ropers, H.H., Mayne, R., Cheah, K.S., Olsen, B.R., Warman, M.L., Brunner, H.G. (1995) Autosomal Dominant And Recessive Osteochondrodysplasias Associated With The Col11A2 Locus. *Cell* 80:431–437.

Vitale, S., Sperduto, R.D., Ferris, F.L. (2009) Increased Prevalence Of Myopia In The United States Between 1971–1972 And 1999–2004. *Arch Ophthalmol* 127:1632–1639.

W

- Walker, V.E., Stelling, J.W., Miley, H.E., Jacob, T.J. (1999) Effect Of Coupling On Volume-Regulatory Response Of Ciliary Epithelial Cells Suggests Mechanism For Secretion. *Am J Physiol.* 276(6 Pt 1):C1432-8.
- Wallman, J., Turkel, J., Trachtman, J. (1978) Extreme Myopia Produced By Modest Change In Early Visual Experience. *Science* 201: (4362): 1249-1251.
- Wallman, J., Adams, J.I. (1987) Developmental Aspects Of Experimental Myopia In Chicks: Susceptibility, Recovery And Relation To Emmetropization. *Vision Res* 27 (7) 1139-1163.
- Wallman, J. (1994) Parental History And Myopia: Taking The Long View. *Jama.* 272:1255–1256.
- Wallman, J., Winawer, J. (2004) Homeostasis Of Eye Growth And The Question Of Myopia. *Neuron* 43: (4): 447-468.
- Wang, Q., Klein, B.E., Klein, R., Moss, S.E. (1994) Refractive Status In The Bea-Ver Dam Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:4344—7.
- Wang, X., Adhikari, N., Li, Q., Hall, J.L. (2004) Ldl Receptor-Related Protein Lrp6 Regulates Proliferation And Survival Through The Wnt Cascade In Vascular Smooth Muscle Cells. (2004) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(6):H2376-83.
- Watanabe, M., & Rodieck, R.W. (1989) Parasol And Midget Ganglion Cells Of The Primate Retina. *J Comp Neurol* 289(3):434-54.
- Weekes, M.P., Antrobus, R., Talbot, S., Hör, S., Simecek, N., Smith, D.L., Bloor, S., Randow, F., Lehner, P.J. (2012) Proteomic Plasma Membrane Profiling Reveals An Essential Role For Gp96 In The Cell Surface Expression Of Ldlr Family Members, Including The Ldl Receptor And Lrp6. *J Proteome Res.* 11(3):1475-84.
- Whatham, A.R., Judge, S.J. (2001) Overnight Lens Removal Avoids Changes In Refraction And Eye Growth Produced By Plano Soft Contact Lenses In Infant Marmosets. *Vision Res* 41:257–265.
- Wicher, G., Larsson, M., Rask Laldskogius, H. (2005) Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (Lrp)-2/Megalin Is Transiently Expressed In A Subpopulation Of Neural Progenitors In The Embryonic Mouse Spinal Cord. *J Comp Neurol* 492: 123-131
- Wicher G., Larsson, M., Fex Svenningsen, A., Gyllencreutz, E., Rask, L., Aldskogius, H. (2006) Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-2/Megalin Is Expressed In Oligodendrocytes In The Mouse Spinal Cord White Matter. *J Neurosci Res* 83: 864-873.
- Wiesel, T.N., Raviola, E. (1977) Myopia And Eye Enlargement After Neonatal Lid Fusion In Monkeys. *Nature* 266: (5597): 66-68.
- Willnow, T.E., Goldstein, J.L., Orth, K., Brown, M.S., Herz, J. (1992) Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein And Gp330 Bind Similar Ligands, Including Plasminogen Activator-Inhibitor Complexes And Lactoferrin, An Inhibitor Of Chylomicron Remnant Clearance. *J Biol Chem* 267(36):26172-80.
- Willnow, T.E., Orth, K., Herz, J. (1994) Molecular Dissection Of Ligand Binding Sites On The Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein. *J Biol Chem* 269(22): 15827-32.
- Willnow, T.E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J.R., Hammer, R.E., Herz, J (1996A) Rap, A Specialized Chaperone, Prevents Ligand-Induced Er Retention And Degradation Of Ldl Receptor-Related Endocytic Receptors. *Embo J* 15(11):2632-9.

- Willnow, T.E., Hilpert, J., Armstrong, S.A., Rohlmann, A., Hammer, R.E., Burns, D.K., Herz, J. (1996B) Defective Forebrain Development In Mice Lacking Gp330/Megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8460-4.
- Wong, T.Y., Foster, P.J., Hee, J., Et Al. (2000) Prevalence And Risk Factors For Refractive Errors In Adult Chinese In Singapore. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: (9): 2486-2494.
- Woo, W.W., Lim, K.A., Yang, H., Et Al. (2004) Refractive Errors In Medical Students In Singapore. *Singapore Med J* 45: (10): 470-474.

X

- Xiao H, Fan Zy, Tian Xd, Xu Yc. (2014) Comparison Of Form-Deprived Myopia And Lens-Induced Myopia In Guinea Pigs. *Int J Ophthalmol*. 7(2):245-50.
- Xu, L., Li, Y., Wang, S., Et Al. (2007) Characteristics Of Highly Myopic Eyes: The Beijing Eye Study. *Ophthalmology* 114: (1): 121-126.

Y

- Yamaguchi, Y., Watanabe, T., Hirakata, A., Hida, T. (2006) Localization and ontogeny of aquaporin-1 and -4 expression in iris and ciliary epithelial cells in rats. *Cell Tissue Res*. 325(1):101-9.
- Yancey, P.G., Ding, Y., Fan, D., Blakemore, J.L., Zhang, Y., Ding, L., Zhang, J., Linton, M.F., Fazio, S. (2011) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. *Circulation* 124(4):454-64.
- Yang, D.H., Smith, E.R., Roland, I.H., Sheng, Z., He, J., Martin, W.D., Hamilton, T.C., Lambeth, J.D., Xu, X.X. (2002) Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 251(1) 27-44.
- Yap, A.S., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M. (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol*. 141(3):779-89.
- Yap, M., Wu, M., Liu, Z.M., Lee, F.L., Wang, S.H. (1993) Role of heredity in the genesis of myopia. *Ophthalmic Physiol Opt*. 13:316-319.
- Ye, Z.J., Go, G.W., Singh, R., Liu, W., Keramati, A.R., Mani, A. (2012) LRP6 protein regulates low density lipoprotein (LDL) receptor-mediated LDL uptake. *J Biol Chem*. 2012 Jan 6;287(2):1335-44.
- Yebra-Pimentel, E., Giraldez, M.J., Glez -Méijome, J.M., Cerviño, A., García-Resúa, C., Parafita, M.A. (2004) Changes in axial length/corneal radius ratio (AL/CR) according to refractive state of the eye. Relationship with ocular components. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 79(7):317-24.
- Young, F.A. (1963) Reading, measures of intelligence and refractive errors. *Am J Optom Arch Am Acad Optom*. 40:257-264.
- Young, F.A. (1967) Myopia and personality. *Am J Optom Arch Am Acad Optom*. 44:192-201.
- Young, T.L., Metlapally, R., Shay, A.E. (2007) Complex trait genetics of refractive error. *Arch Ophthalmol* 125: (1): 38-48.
- Yun, M., Keshvara, L., Park, C.G., Zhang, Y.M., Dickerson, J.B., Zheng, J., Rock, C.O., Curran, T., Park, H.W. (2003) Crystal structures of the Dab homology domains of mouse disabled 1 and 2. *J Biol Chem* 19;278(38):36572-81.

Z

- Zerial, M., & McBride, H. (2001) Rab Proteins As Membrane Organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):107-17. Review. Erratum In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3):216.
- Zheng, G., Bachinsky, D.R., Stamenkovic, I., Strickland, D.K., Brown, D., Andres, G., McCluskey, R.T. (1994) Organ Distribution In Rats Of Two Members Of The Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family, Gp330 And Lrp/Alpha 2Mr, And The Receptor-Associated Protein (Rap). *J Histochem Cytochem* 42(4):531-42.
- Zhu, G., Hewitt, A.W., Ruddle, J.B., Kearns, L.S., Brown, S.A., Mac-Kinnon, J.R., Et Al. (2008) Genetic Dissection Of Myopia: Evidence For linkage Of Ocular Axial Length To Chromosome 5Q. *Ophthalmology* 115:1053E2—7E2.
- Zlokovic, B.V., Martel, C.L., Matsubara, E., McComb, J.G., Zheng, G., McCluskey, R.T., Frangione, B., Ghiso, J. (1996) Glycoprotein 330/Megalin: Probable Role In Receptor-Mediated Transport Of Apolipoprotein J Alone And In A Complex With Alzheimer Disease Amyloid Beta At The Blood-Brain And Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4229-4234.

ANNEXE

Antigène	Espèce	Dilution	Source
Afadin	Rabbit monoclonal	1 : 100	Invitrogen
Claudin-1	Rabbit polyclonal	1 : 50	Invitrogen
Connexin-43	Rabbit polyclonal	1 : 600	Sigma-Aldrich
Dab-1	Rabbit polyclonal	1 : 250	Santa Cruz
Dab-2	Rabbit polyclonal	1 : 250	Santa Cruz
Eea1	Mouse monoclonal	1 : 800	BD Transduction
Lamp1	Mouse monoclonal	1 : 800	StressMarq
Megalin	Sheep polyclonal	1 : 4000	Home made
Nectin 1	Rat monoclonal	1 : 100	Acris
Nectin 3	Rat monoclonal	1 : 100	Acris
Phalloïdin	<i>Amanita phalloïdes</i>	2U	Invitrogen
Occludin	Mouse monoclonal	1 : 250	Invitrogen
Rab7	Rabbit monoclonal	1 : 100	Santa Cruz
ZO-1	Rabbit polyclonal	1 : 70	Invitrogen

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

I-Injection des protéine fluorescentes

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de Kétamine (100 mg/kg, Imalgen/Merial, Lyon France) et de Xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer, Puteaux, France). L'efficacité de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexes moteur, en effectuant une pression sur la patte arrière de l'animal. Une injection rétro-orbital d'albumine couplée à l'Alexa488 (Invitrogen, A13100) est effectuée. Au terme d'un temps prédéfini à l'avance, la cage thoracique est ouverte, l'oreillette droite incisée puis une perfusion intra-cardiaque de paraformaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich) dans 0.2M de tampon phosphate 50% (Sigma-Aldrich) est réalisée par le ventricule gauche jusqu'au durcissement total de la souris.

II-Immunomarquage

i-Immunohistochimie

Suivant le même protocole que précédemment, la liste des anticorps utilisés pour l'étude est rapportée dans le tableau 1.

iii-Duolink

Les interactions entre deux protéines ont été mis en évidence par la technique du Duolink (Sigma Aldrich). Ce procédé permet de mettre en évidence une interaction par l'utilisation d'une polymérase qui va amplifier, si la liaison il y a eu, la fluorescence des deux sondes spécifiques des protéines. Les expériences de Duolink ont été réalisées en utilisant le kit (Duolink In Situ) (Olink Bioscience, Uppsala, Suède).

II-Co-immunoprécipitation

Les extraits protéiques ont été collectés dans du tampon de lyse (MB 1X contenant 1% de TritonX-100 et 1% d'inhibiteur de protéases (Thermo Scientific) à partir de rétine et de corps ciliaires de souris contrôles et mutantes. Les tissus ont été broyés et centrifugés pendant 30 minutes à 4°C à 10000 rpm. Pour les expériences de co-immunoprécipitation, l'anticorps anti-mégaline est couplé sur des billes de sépharose (GE Healthcare). Les billes couplées sont conservées à 4°C dans une solution de MB 1X au moins 3 heures. Puis on incube les billes avec les extraits de tissus (v/v) à 4°C sous agitation douce. Le lendemain les billes ont été lavées 6 fois, 4 fois dans du tampon MB 1X et 2 fois avec du tampon MB 1X contenant 0.01% de Tween 20 (Sigma-Aldrich). Enfin du LDS 4X (Invitrogen) et un agent réducteur (Invitrogen) ont été ajoutés. Les billes sont chauffées 10 minutes à 70°C, et soumises à un transfert sur gel SDS-PAGE.

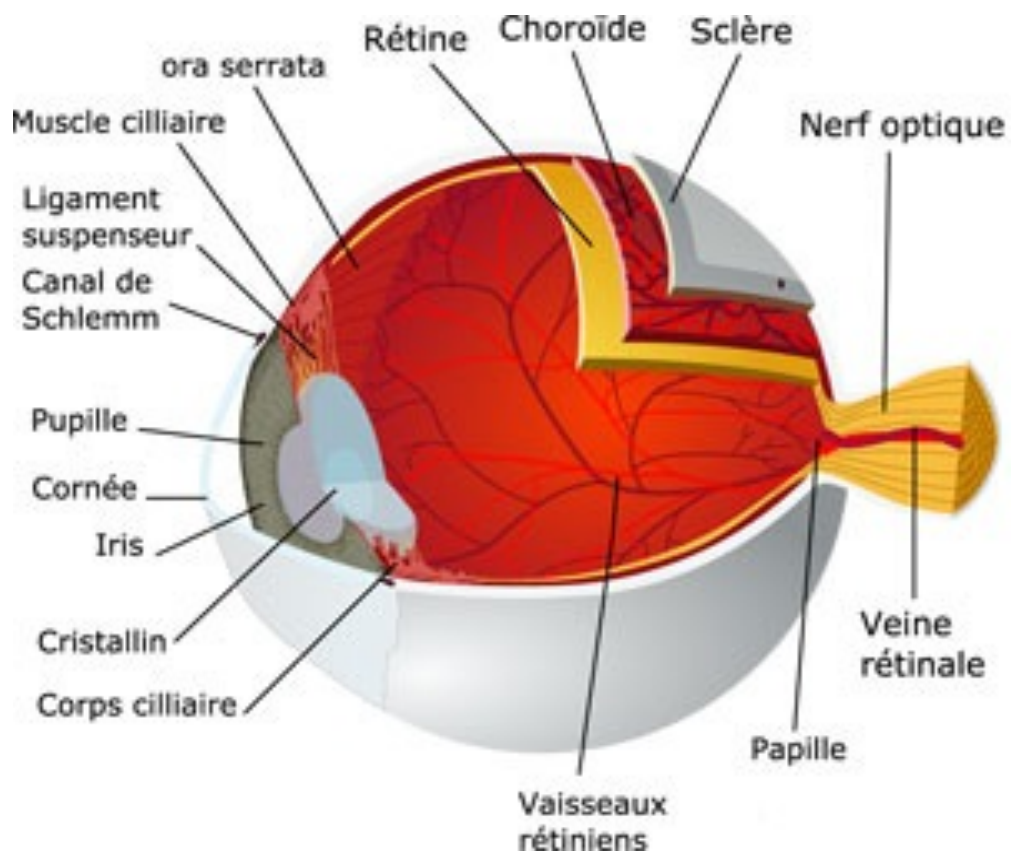


Figure 1 : Coupe sagittale horizontale de l'œil humain adulte.

<http://www.lewebpedagogique.com>

I-L'œil

I-1-Description générale de l'œil

L'œil est un organe neurosensoriel qui permet de capter l'information lumineuse pour la convertir en stimulus électrique et la transmettre au cortex visuel. Dans un premier temps, l'information lumineuse entre jusqu'au segment antérieur de l'œil, puis, dans la partie postérieure, la transduction de ce signal par la rétine est transmise au cortex visuel.

Le globe oculaire (Figure 1) est composé de trois tuniques concentriques. La plus externe est la tunique fibreuse, elle se compose de la sclère dans sa partie postérieure et de la cornée dans sa partie antérieure. Elle délimite l'œil et permet de contenir la pression interne et de le protéger contre les agressions mécaniques. Ensuite se situe la tunique uvéale. Elle se compose de trois éléments, la plus antérieure est la choroïde, puis vient le corps ciliaire et enfin dans la partie postérieure, se trouve l'iris. La choroïde est formée d'un réseau de vaisseaux sanguins qui assurent l'apport en oxygène et en nutriments de l'iris, de l'épithélium pigmentaire rétinien ainsi que des cellules photoréceptrices de la rétine neurale. Enfin le corps ciliaire joue un rôle dans la production de l'humeur aqueuse qui remplit la chambre antérieure de l'œil (Cf. I-3). Ce liquide transparent est filtré et sécrété en permanence. Son rôle est de maintenir la pression intraoculaire en coopération avec le corps vitré. Elle permet aussi l'apport en nutriments à certains tissus, comme la cornée et le cristallin. Enfin, à la limite de la sclérotique et de la cornée, l'uvée s'amincit pour former l'iris. Elle est une membrane circulaire et contractile, constituant la partie colorée visible de l'oeil. La partie la plus antérieure du globe oculaire est la tunique nerveuse de l'oeil. Elle est une expansion du système nerveux central et correspond à la rétine. Située sous la choroïde, elle est en contact direct avec le corps vitré. Composé à 99% de fibres de collagène et d'eau, il est un gel transparent qui remplit la chambre postérieure de l'oeil, entre le cristallin et la rétine. Tout comme l'humeur aqueuse, le corps vitré permet de maintenir la pression intraoculaire constante. Mais il permet aussi de maintenir la rétine et les autres tisus oculaires en place, *via* une absorption des chocs et une réductions des déformations mécaniques. C'est au niveau de la rétine que se fait le codage de l'information visuelle en signaux électriques.

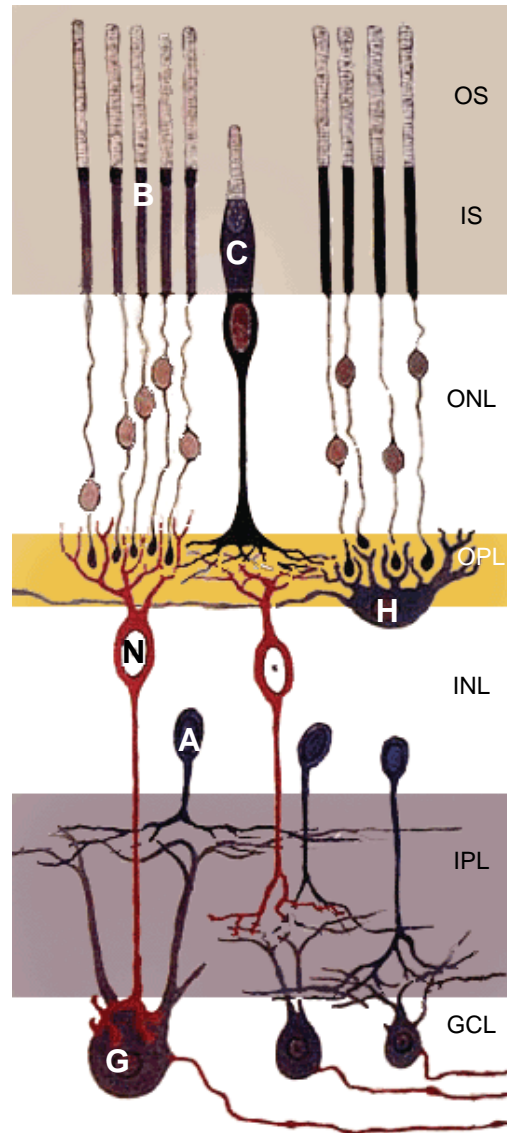


Figure 2 : Organisation stratifiée de la rétine.

Dessin des différentes couches composant une rétine de vertébrés

Lamination de la rétine : OS (Segment externe des photorécepteurs), IS (Segment interne des photorécepteurs), ONL (Couche nucléaire externe), OPL (Couche plexiforme externe), INL (Couche nucléaire interne), IPL (Couche plexiforme interne), GCL (Couche des cellules ganglionnaires)

Cellules de la rétine: B (Bâtonnet), C (cône), H (Cellule horizontale), N (Neurone bipolaire), A (Cellule amacrine), G (Cellule ganglionnaire). *Basé sur un dessin de Ramón y Cajal.*

La lumière traverse d'abord la cornée qui a un rôle de filtre pour les rayons ultraviolets du soleil et est aussi la première lentille que traverse la lumière permettant ainsi une focalisation sur le cristallin. Ensuite la lumière parvient à l'iris; Il joue un rôle de diaphragme permettant ainsi une adaptation de l'œil à la lumière pénétrante via des contractions ou relâchements de la perforation en son centre: la pupille. Le cristallin est la deuxième lentille traversée par la lumière. Il permet une projection de celle-ci sur la rétine, projection rendue possible par la transparence du cristallin et sa courbure. Les variations de sa courbure grâce aux contractions et relâchements des muscles ciliaires qui le retiennent permettent l'accommodation, c'est à dire une mise au point d'un objet en fonction de sa distance. Pour finir la lumière atteint la rétine; composée de l'épithélium pigmentaire rétinien qui a pour rôle d'empêcher la lumière de diffuser dans l'œil, et de la neurorétine responsable de la transformation de l'information lumineuse en information électrique. Ce codage est rendu possible grâce à une lamination précise de la rétine (Figure 2).

I-2-La rétine

La rétine est un tissu structurellement très ordonné. Cette organisation est fortement conservée chez les vertébrés (Figure 2). Elle est décrite ci-dessous selon un axe antéro-postérieur puis selon un axe centro-périphérique.

I-2-1-Organisation structurale et cellulaire de la rétine

Organisation antéro-postérieur :

La rétine se présente sous la forme de deux feuillets: l'épithélium pigmentaire rétinien et la rétine neurale. Le premier, une monocouche, constitue la couche externe pigmentée de la rétine et le deuxième, non pigmenté, est constitué de six couches successives.

La couche la plus antérieure est l'épithélium pigmentaire rétinien; constitué d'une monocouche de cellules pigmentées qui synthétisent la mélanine. Leur membrane apicale forme des invaginations, enveloppant les segments externes des cellules photoreceptrices (Figure 3). D'un côté l'épithélium pigmentaire rétinien absorbe l'énergie lumineuse qui n'a

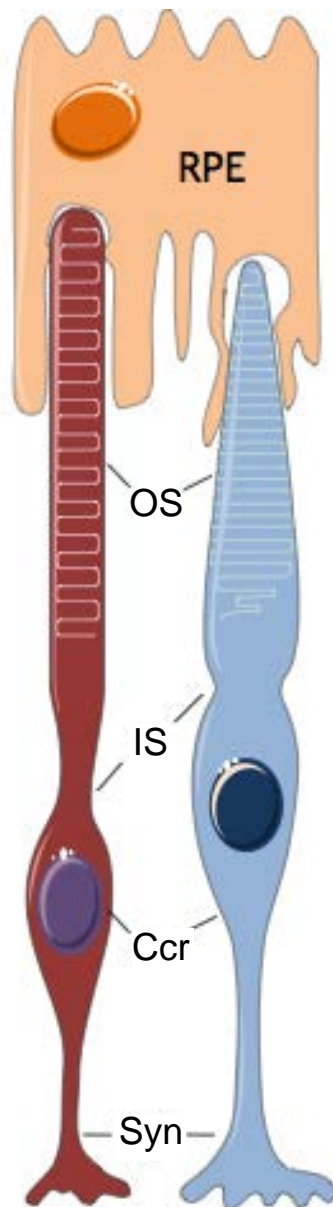


Figure 3 : Illustration de la morphologie des Cônes et des Bâtonnets.

Représentation schématique de la morphologie des cônes et des bâtonnets: Syn (Synapse), Ccr (Corps cellulaire), IS (segment interne), OS (Segment externe), RPE (Epithélium pigmenté rétinien). *Adaptée de Swaroop et al., 2010 et de Servier Medical Art.*

pu être entièrement captée par les cellules photoréceptrices. De l'autre côté il permet le renouvellement des segments externes des cellules photoréceptrices qu'il phagocyte. Il assure le transport en oxygène et en nutriments des cellules photoréceptrices, mais aussi l'élimination des déchets métaboliques vers la circulation choroïdienne.

Ensuite, se situe la couche nucléaire externe; elle est principalement composée par les corps cellulaires des cellules photoréceptrices. Ce sont ces cellules neuronales qui sont capables de convertir l'information lumineuse en signal électrique, ceci grâce à la présence de pigments, durant la phase de phototransduction. Il existe deux types de cellules photoréceptrices : les cônes et les bâtonnets (Figure 3). Les premiers sont impliqués dans la vision photopique et celle des couleurs, tandis que les bâtonnets sont impliqués dans la vision scotopique. Ces deux types de cellules photoréceptrices ont une organisation intracellulaire similaire: 1. Un segment externe qui contient les pigments dans des disques membranaires, formés par l'invagination de la membrane plasmique, il est le siège de la phototransduction, 2. Un segment interne contenant le noyau cellulaire et qui se prolonge par une terminaison synaptique permettant ainsi le contact avec les autres cellules nerveuses; les neurones bipolaires ou les cellules horizontales (Figure 2). Ces terminaisons synaptiques se trouvent dans la couche plexiforme externe. Elles forment des triades synaptiques, c'est à dire qu'une connexion s'établit entre les cellules photoréceptrices et les neurones bipolaires, mais aussi les cellules horizontales (Figure 2). Les corps cellulaires de ces deux derniers types cellulaires et ceux des cellules amacrines sont contenus dans la couche nucléaire interne (Figure 2). Les neurones bipolaires sont impliqués dans la transmission du signal provenant des cellules photoréceptrices vers les cellules ganglionnaires. Chaque neurone bipolaire est spécifique soit d'une cellule photoréceptrice à bâtonnet soit à cône. Il existe deux grands types de cellules horizontales, classés selon leur spécificité (Figure 4). Alors que les cellules horizontales H1 établissent des connexions synaptiques avec les cônes et les bâtonnets, les cellules horizontales H2 ne le font qu'avec les cônes. Ces cellules ont pour fonction de moduler le signal nerveux transmis par les cellules photoréceptrices aux neurones bipolaires. Cette modulation se fait par la libération du neurotransmetteur inhibiteur GABA (Puller et al., 2014, Thoreson & Mangel, 2012). Les cellules amacrines établissent des connexions avec les neurones bipolaires, les cellules ganglionnaires, mais aussi entre elles. On dénombre quarante types de cellules amacrines (Figure 4), classés selon leur morphologie, leur taille ou le nombre de dendrites et enfin leur localisation. En effet un type de cellules amacrines que l'on appelle « déplacées » se retrouve dans la couche des cellules ganglionnaire

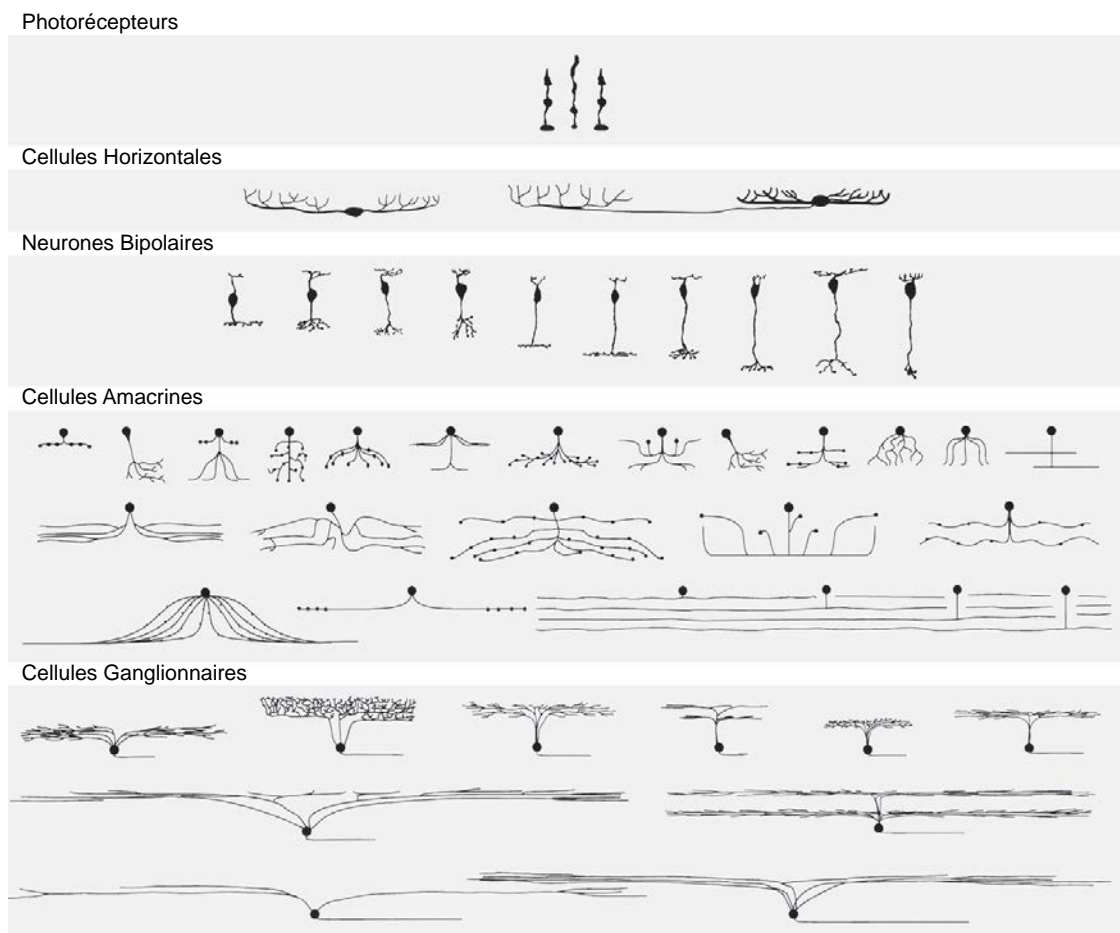


Figure 4 : Diversité des sous-types cellulaires de la rétine.

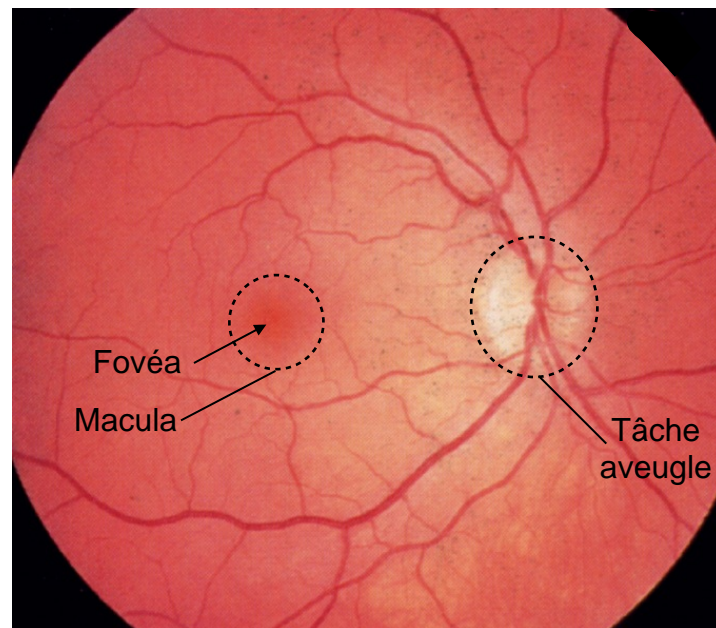
Dessin représentant la diversité des Photorécepteurs, Cellules horizontales, Neurones bipolaires, Cellules amacrines et les cellules ganglionnaire. *Adapté de Masland et al., 2001.*

(Perry & Walker, 1980). De même que pour les cellules horizontales, ces cellules ont pour rôle de moduler le signal *via* la libération de neurotransmetteur, mais les cellules amacrines ne libèrent pas toutes le même, il existe d'ailleurs des sous types de cellules amacrines différenciées selon le neurotransmetteur qu'elles libèrent (Kolb et al., 2002). La couche nucléaire interne contient aussi des cellules gliales de Müller. Leurs fonctions, proche de celles des astrocytes dans le système nerveux central, seraient un soutien protecteur et nourricier pour toutes les autres cellules de la rétine (Newman & Reichenbach, 1996; Singh et al., 2014). En effet les cellules gliales de Müller traversent toute l'épaisseur de la rétine formant des jonctions avec les photorécepteurs dans la couche nucléaire externe mais aussi avec les cellules ganglionnaires pour former la membrane limitante interne au niveau du vitré. Leurs prolongements participent de façon active à la mise en place de la barrière hémato-rétinienne, puisque ils entourent les capillaires sanguins.

Les neurones bipolaires et les cellules amacrines établissent des connexions synaptiques avec les cellules ganglionnaires au niveau de la couche plexiforme interne. Cette couche est composée de cinq sous-couches parallèles entre elles. Chacune de ces sous-couches correspond à un type de connexion spécifique. Ces connexions ont lieu entre les cellules bipolaires, amacrines, et les cellules ganglionnaires (Matsuoka et al., 2013) (Figure 2).

La couche la plus interne est la couche des cellules ganglionnaires. Elle contient essentiellement les cellules ganglionnaires (Figure 2). Ces cellules reçoivent l'information électrique et la transmettent au cerveau *via* leurs axones qui se rejoignent pour former le nerf optique. L'information est reçue grâce aux différentes connexions synaptiques qu'elles établissent avec soit les neurones bipolaires ou les cellules amacrines. Il en existe deux grands types, classés selon leur fonction, les cellules ganglionnaires de type P (pour Parvus) et de type M (pour Magnus) (Kaplan & Shapley, 1986) (Figure 4). Les premières, majoritaires, sont impliquées dans la transmission de l'information colorée, de la forme et du détail. Tandis que les secondes sont responsables de la détection du mouvement. (Watanabe & Rodieck, 1989). La couche des cellules ganglionnaires contient aussi les cellules amacrines « déplacées ».

A



B

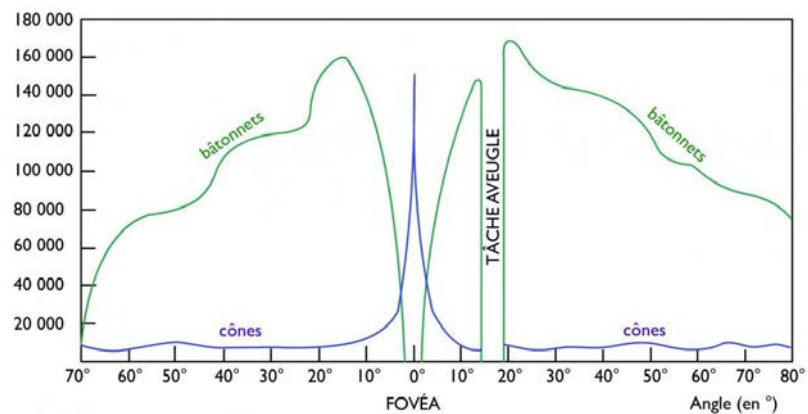


Figure 5 : Organisation centro-périphérique de la rétine.

(A) Fond d'œil humain. (B) Diagramme de la répartition des photorécepteurs dans la rétine humaine; nombre de photorécepteurs par mm² en fonction de l'angle à la fovéa. *Adapté de Häggstroöm, M. « Medical gallery of Mikael Häggstroöm »*

Organisation centro-périphérique :

La fovéa, centre de la rétine, est la région la plus importante de la rétine humaine. Elle contient la majorité des cônes, mais en revanche ne contient aucune cellules photoréceptrices à bâtonnets (Figure 5). La concentration de ces dernières ne cesse de croître au fur et à mesure que l'on s'éloigne de cette zone, pour décroître à nouveau vers la périphérie de la rétine (Chui et al., 2008).

Il existe un point de la rétine où aucune cellule photoréceptrice n'est présente. C'est la tache aveugle, elle correspond à la réunion de tous les axones des cellules ganglionnaires qui forme ainsi le nerf optique. Ce point aveugle correspond aussi au point d'entrée et de sortie de la vascularisation rétinienne (Figure 5).

I-2-2-Fonction de la rétine

La fonction de la rétine est de traiter le stimulus lumineux, pour le convertir en signal électrique, et de le transmettre à travers les différents types cellulaires de la rétine afin que l'information arrive au cortex.

La première étape est de capter l'information lumineuse. On appelle cette étape la phototransduction, elle permet la conversion du stimulus lumineux en information électrique. Elle est réalisée par les segments externes des cellules photoréceptrices, quand la lumière atteint les cellules photoréceptrices, la conformation des pigments contenus dans les segments externes change, induisant une cascade de réactions biochimiques qui a pour résultat la modification du potentiel membranaire des cellules photoréceptrices permettant ainsi l'encodage du stimulus lumineux (Lambrecht & Koch, 1991).

La deuxième étape est la transmission de l'information électrique à travers la rétine. Il en existe deux types : la transmission verticale et la transmission horizontale.

La transmission verticale : la première étape s'effectue au sein de la couche plexiforme externe, entre les cellules photoréceptrices et les neurones bipolaires. Ensuite la transmission s'effectue dans la couche plexiforme interne, entre les neurones bipolaires et les cellules ganglionnaires. Cette transmission se fait au niveau des synapses, *via* la libération du neurotransmetteur excitateur glutamate. Il existe un type de synapse

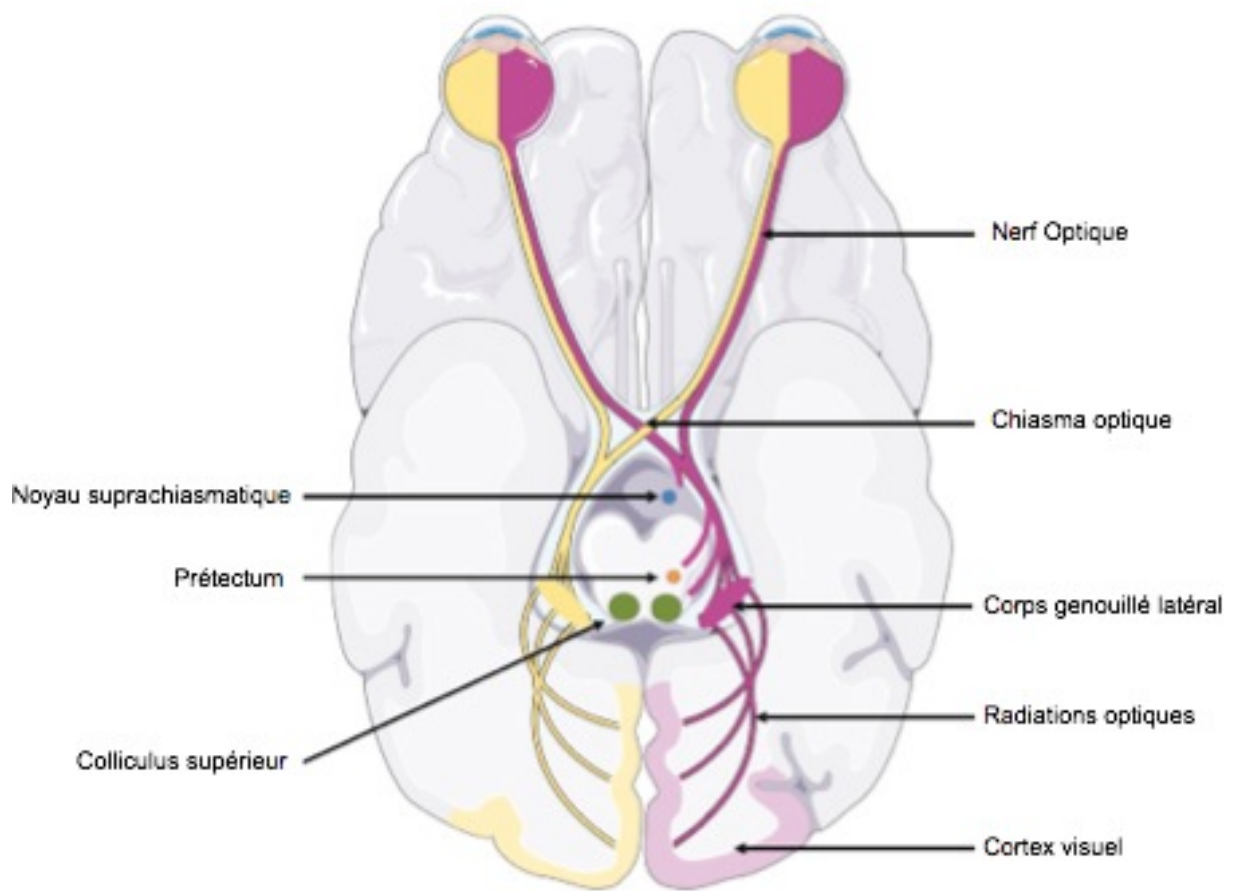


Figure 6 : Les afférences du nerf optique.

Représentation schématique des innervations du nerf optique dans le cortex humain. *Adaptée de Purves et al., 2004 et de Servier Medical Art.*

spécifique à la rétine : « la synapse en rubans », qui par sa structure et son fonctionnement permet une vitesse de transmission optimisée, en comparaison à une synapse courante (Mercer & Thoreson, 2011).

La transmission horizontale : Cette transmission a lieu entre les cellules horizontales et les cellules amacrines. Ces deux types cellulaires libèrent le neurotransmetteur inhibiteur GABA, permettant ainsi une modulation de l'information lors de la transmission verticale.

La dernière étape est de transmettre cette information au cortex *via* le nerf optique. Les axones des cellules ganglionnaires qui forment le nerf optique vont se croiser au niveau du chiasma optique, et transporter l'information jusqu'au niveau du corps genouillé latéral, qui joue le relais entre la rétine et le cortex visuel. Ensuite cet ensemble d'axones forment des radiations optiques qui vont innervier le cortex visuel primaire (Figure 6). Une partie des axones innervent le corps genouillé latéral, une autre innervent le noyau supra-chiasmatique, permettant de mettre en place le rythme circadien naturel, l'horloge biologique jour/nuit. Enfin la dernière partie des axones des cellules ganglionnaires innervent le prétectum, noyau situé dans le mésencéphale qui permet le contrôle de l'ouverture de l'iris (Figure 6).